



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

Técnicas Laboratoriais na Área do Ambiente e da Microbiologia

Relatório de Atividade Profissional

por

Sílvia Maria de Magalhães Cruz Faia

outubro de 2015



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

Relatório descritivo do percurso profissional para requerer creditação conducente à
obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente

por

Sílvia Maria de Magalhães Cruz Faia

Orientação: Professora Doutora Paula Castro

outubro de 2015

Agradecimentos

Sendo este trabalho mais uma das muitas etapas importantes do meu percurso académico e também pessoal, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a concretização do mesmo.

Em primeiro lugar à minha orientadora Professora Paula Castro, pela orientação, apoio e estímulo.

Ao Professor Rui Boaventura, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), pelas informações cedidas, sugestões, apoio e incentivo.

Aos Professores Olga Nunes, Manuel Simões, Filipe Mergulhão e Fernando Pereira da FEUP, por todos os conhecimentos transmitidos e o encorajamento para desempenhar mais e melhor as minhas funções.

À Carmen, Ana Catarina e Ana Luísa pelo incentivo e ajuda na formatação deste relatório, assim como a amizade.

Aos meus colegas do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da FEUP, especialmente à Paula, Carla e Liliana, agradeço-lhes a ajuda, o companheirismo, a amizade e todas as palavras de incentivo.

Ao DEQ da FEUP pela disponibilização de meios necessários para realização da minha atividade profissional.

À minha família, em especial ao Marco, Ana Miguel e Vasco, pelo apoio incondicional, incentivo e confiança sempre depositada em mim.

A todos o meu muito obrigada.

Sumário

O presente relatório de atividade profissional visa obter o grau de Mestre em Engenharia do Ambiente de acordo com o estabelecido no regime de condições especiais para licenciados “pré-Bolonha” com um mínimo de 5 anos de experiência profissional.

No presente relatório apresenta-se um resumo das atividades desenvolvidas no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto que passam pelo apoio a aulas laboratoriais, estágios profissionais, dissertações de mestrado e teses de doutoramento, elaboração de protocolos e implementação de trabalhos para as aulas práticas, realização de análises microbiológicas em águas para consumo humano, superficiais e balneares e apoio a iniciativas do referido departamento e/ou Universidade do Porto.

O percurso académico e profissional permitiu a aquisição de conhecimento e competências na área da Engenharia do Ambiente e o desenvolvimento da capacidade de trabalho em equipa, capacidade organizacional e competências sociais.

A constante vontade em atualizar conhecimentos e adquirir novas competências técnicas foram um incentivo para realização deste trabalho.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Competências Adquiridas	6
2. Trabalho Desenvolvido	9
2.1. Apoio ao Ensino.....	9
2.1.1. Microbiologia Ambiental	15
2.1.2. Laboratório de Ciências do Ambiente III.....	20
2.1.3. Ciências Biológicas	22
2.1.4. Bioquímica Microbiana	25
2.1.5. Engenharia das Fermentações	27
2.1.6. Engenharia Enzimática	30
2.1.7. Engenharia de Proteínas	32
2.1.8. Microbiologia Geral	36
2.1.9. Tecnologia Ambiental	40
2.1.10. Tecnologia Alimentar	41
2.2. Trabalhos para o exterior	43
2.3. Apoio a dissertações/teses	56
2.4. Orientação de estágios	59
2.5. Apoio a iniciativas FEUP/DEQ	59
3. Conclusões	63
4. Perspetivas Futuras.....	65
5. Referências.....	67
Anexo	69
I. Manuais de Instrução de Equipamentos	71
I.1. Instruções de utilização da centrífuga Eppendorf 5424	71
I.2. Instruções de utilização da centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R	73

I.3.	Instruções de utilização do sistema para eletroforese em géis de agarose (Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System – Bio-Rad)	77
I.4.	Instruções de utilização do sistema para electroforese em géis de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® 3 Cell- Bio-Rad)	82
I.5.	Instruções de utilização do Instruções de utilização do termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad)	90
I.6.	Instruções de utilização do transiluminador	97
I.7.	Instruções de utilização do Leitor de Microplacas Bioteck Synergy HT	99
II.	Gráficos de Utilização dos Equipamentos	112
III.	Protocolos	115
III.1.	Water quality – detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria (ISO 9308-1)	115
III.2.	Water quality – detection and enumeration of intestinal enterococci (ISO 7899-2)	116
III.3.	PNA-FISH para identificação de um microrganismo	117
III.4.	Caracterização físico-química e reológica de iogurtes	122
III.5.	Secagem de maçã	128
IV.	Boletins de Análise	134
IV.1.	Modelo utilizado para análise das águas da FEUP	134
IV.2.	Modelo utilizado na determinação da <i>E.coli</i> e Enterococos fecais	135
IV.3.	Modelo utilizado na determinação de coliformes totais, fecais e enterococos fecais	136

Índice de Figuras

No texto principal:

Figura 1.1 - Organograma institucional da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.	1
Figura 1.2 - Fotografia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto – Polo da Asprela.....	2
Figura 1.3 - Organograma do Departamento de Engenharia Química.	2
Figura 1.4 - Esquema representativo do Departamento de Engenharia Química.....	3
Figura 1.5 - Recursos humanos do Departamento de Engenharia Química.	4
Figura 2.1 – Fotografia representativa do tratamento do efluente de tingimento têxtil por coagulação/floculação	10
Figura 2.2 – Fotografia representativa do tratamento do efluente da indústria do papel por flutuação.	10
Figura 2.3 - Fotografia representativa da remoção do fenol por adsorção.	11
Figura 2.4 – Fotografia representativa do tratamento da água residual gerada na indústria de tingimento têxtil por processo oxidativo avançado de Fenton: A- Efluente a tratar, B- Início da reação, C- Após tratamento.	11
Figura 2.5 - Métodos de esterilização.....	16
Figura 2.6 - Exemplos de meios seletivos utilizados para isolar diferentes microrganismos. Rose Bengal Chloramphenicol Agar – <i>Rhodotorula rubra</i> ; Cetrimide Agar – <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; Mannitol Salt Phenol-Red Agar - <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; mfc Agar - <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 2.7 - Técnica de coloração de Gram.....	17
Figura 2.8 – Técnica de coloração de endósporos.....	18
Figura 2.9 - Teste O/F. Meios antes e depois de inoculados.	18
Figura 2.10 - Teste da catalase positivo (A) e teste da oxidase negativo (B).....	19
Figura 2.11 - Resultados de um antibiograma realizado pelos alunos.	19
Figura 2.12 - Análise bacteriológica de águas pela técnica das membranas filtrantes...	20
Figura 2.13 - Esquema do método de enumeração da <i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes.	21
Figura 2.14 - Esquema do método de enumeração dos enterococos.	21
Figura 2.15 - Técnicas de espalhamento e estriamento.	23
Figura 2.16 - Curva de crescimento teórica.....	24

Figura 2.17 - Curvas de crescimento obtidas pelos alunos.	24
Figura 2.18 - Representação simplificada do teste da resazurina.	26
Figura 2.19 - Qualidade do leite – teste da resazurina.	27
Figura 2.20 - Aplicação da técnica titulométrica para a determinação da taxa de transferência de oxigênio.	29
Figura 2.21 - Inoculação de um biorreator para produção de Penicilina-G.	30
Figura 2.22 - Representação esquemática dos vector de expressão pET-28a(+) e pFM23.	33
Figura 2.23 - Cromatografia por afinidade e processo de diálise.	33
Figura 2.24 - Quantificação da proteína.	34
Figura 2.25 - Representação esquemática da cromatografia em gel SDS-PAGE.	34
Figura 2.26 – Gel de proteínas e marcador de peso.	35
Figura 2.27 - Eletroforese em gel de agarose.	37
Figura 2.28 - PCR-Amplificação dos fragmentos.	37
Figura 2.29 - Representação esquemática dos diferentes fragmentos que compõe o marcador de peso molecular e respetivo tamanho.	38
Figura 2.30 - Determinação da CQO - digestor e tubos após digestão.	40
Figura 2.31 - Comparação do aspecto das maçãs sem tratamento (A) e após tratamentos com ácido ascórbico 1% (B) e NaCl 1% (C) com aspeto das maçãs após aproximadamente 5 horas de secagem.	42
Figura 2.32 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.	44
Figura 2.33 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.	45
Figura 2.34 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.	45
Figura 2.35 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.	46
Figura 2.36 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.	46
Figura 2.37 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.	47
Figura 2.38 - Estações de amostragem para a caracterização da água.	48

Figura 2.39 - Estações de amostragem para a caracterização de sedimentos.....	48
Figura 2.40 - Localização esquemática dos pontos de monitorização.	49
Figura 2.41 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.....	50
Figura 2.42 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, nos afluentes do Rio Minho.....	50
Figura 2.43 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.....	51
Figura 2.44 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, nos afluentes do Rio Minho.....	51
Figura 2.45 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.....	52
Figura 2.46 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.....	52
Figura 2.47 - Estações de amostragem para a caracterização da água.	53
Figura 2.48 - Evolução dos coliformes totais ao longo das várias campanhas.	54
Figura 2.49 - Evolução da <i>E. coli</i> ao longo das várias campanhas.....	54
Figura 2.50 - Evolução dos enterococos fecais ao longo das várias campanhas.....	55

Em Anexo:

Figura A.1 - Visor e painel de controlo da centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R....	74
Figura A.2 - “Tray” e “gel caster” para polimerização de géis de agarose.	78
Figura A.3 - Componentes e tina de eletroforese do sistema Sub-Cell GT.....	79
Figura A.4 - Vista frontal da fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-Rad).....	80
Figura A.5 - Montagem do sistema de vidros para preparação do gel de acrilamida. ...	82
Figura A.6 - Introdução do sistema de vidros na “casting frame” (A) e bloqueio da mesma (B) para assegurar que os vidros de mantêm unidos.	83
Figura A.7 - Colocação da “casting frame” no suporte para polimerização dos géis. ...	83
Figura A.8 - Remoção do sistema de vidros da “casting frame”.....	85
Figura A.9 - Introdução do sistema de vidros no suporte com os elétrodos.....	86
Figura A.10 - Introdução dos vidros+elétrodos na “clamping frame” (A) e procedimento para manter o sistema fechado e bem vedado (B).	86
Figura A.11 - Introdução da câmara de eletroforese interior no tanque.....	87
Figura A.12 - Vista frontal da fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-Rad).....	88
Figura A.13 - Vista frontal do termociclador MJ Mini Cyclor.....	90
Figura A.14 - Painel de controlo do termociclador MJ Mini Cyclor (A) e pormenor do menu principal no visor (B).....	91
Figura A.15 - Exemplo de criação de um programa de temperaturas com gradiente. ...	97
Figura A.16 – Representação gráfica da utilização do microscópio por laboratório. ..	112
Figura A.17 – Representação gráfica da utilização da centrífuga Eppendorf por laboratório.....	112
Figura A.18 – Representação gráfica da utilização da centrífuga Beckman por laboratório.	113
Figura A.19 – Representação gráfica da utilização da câmara de fluxo laminar por laboratório.....	113
Figura A.20 – Representação gráfica da utilização da autoclave nº1 por laboratório..	113
Figura A.21 – Representação gráfica da utilização autoclave nº2 por laboratório.....	114
Figura A.22 – Representação gráfica da utilização do leitor de microplacas por laboratório.....	114
Figura A.23 Viscosímetro VISCO STAR PLUS.	124

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Unidades curriculares lecionadas nos laboratórios de Tecnologias, de Microbiologia e Biologia Celular e Molecular.....	13
Tabela 2.2 - Trabalhos realizados e unidades curriculares interligadas	14
Tabela 2.3 - Classificação dos meios de cultura.....	15
Tabela 2.4 - Resultados do teste da resazurina.....	26
Tabela 2. 5 - Composição dos geis de proteínas.....	35

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Na atualidade a FEUP ministra um curso de licenciatura e um mestrado, 9 mestrados integrados, 2 doutoramentos e 21 programas doutorais (alguns em colaboração com outras Universidades), desenvolvendo também actividades de investigação e inovação de nível internacional. Assim sendo, verifica-se uma transmissão e difusão de conhecimentos com formação de profissionais de elevado nível e futuros líderes na área da engenharia e afins, assim como a promoção do bem-estar da sociedade global.

A organização da FEUP passa por um Conselho de Representantes que nomeia o Diretor que por sua vez delega funções nos Conselhos Científico, Pedagógico e Executivo e no Órgão de Fiscalização conforme se esquematiza na Figura 1.1.

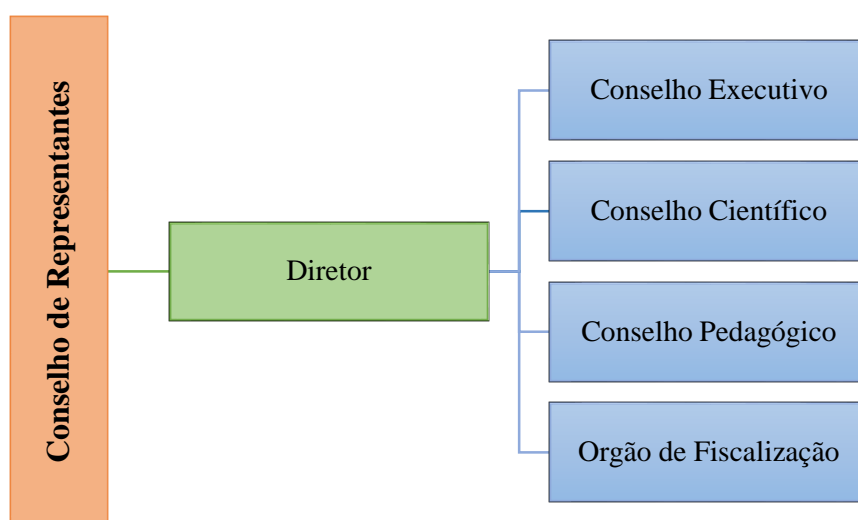


Figura 1.1 - Organograma institucional da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Para obtenção de informação mais detalhada sobre a atividade e modo de funcionamento da FEUP está disponível em www.fe.up.pt.

A FEUP tem 84000 m² de edifícios, mais de 23000 m² de áreas verdes, mais de 8000 estudantes e 442 professores e investigadores (ETI) distribuídos por nove departamentos, entre os quais o Departamento de Engenharia Química (DEQ) – Figura 1.2.



Figura 1.2 - Fotografia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto – Polo da Asprela.

A missão e objectivos do DEQ/FEUP são assegurar e/ou apoiar: i) o ensino em cursos de licenciatura/ mestrado integrado, pós-graduação e formação contínua da FEUP, ii) a investigação científica e o desenvolvimento tecnológico, e iii) a prestação de serviços ao exterior.

A organização e gestão do DEQ passam por um Diretor que pode delegar funções na Comissão Executiva, Conselho de Departamento e Assessorias para 4 áreas de intervenção distintas. Na Figura 1.3 apresenta-se o organograma do departamento.

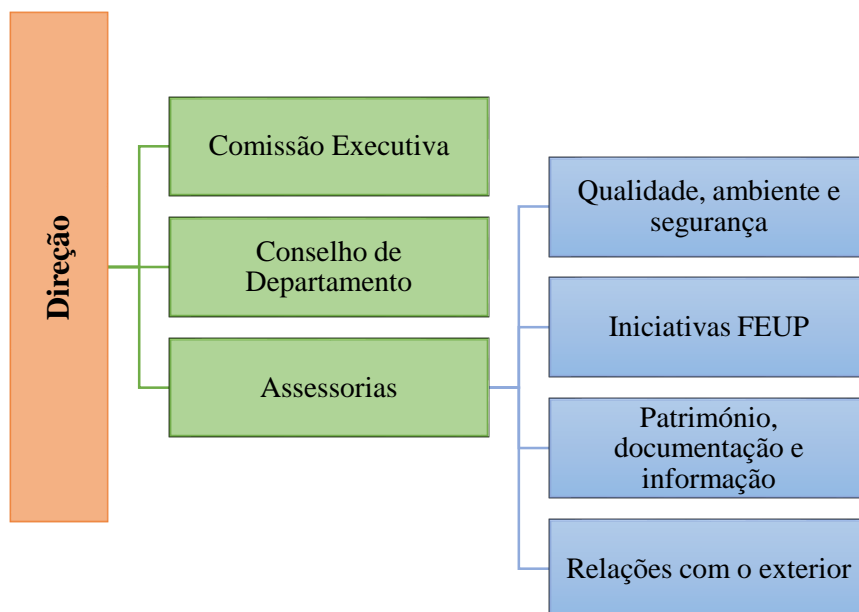


Figura 1.3 - Organograma do Departamento de Engenharia Química.

Atualmente, o DEQ assegura o Mestrado Integrado em Engenharia Química (MIEQ), e tem uma participação relevante nos Mestrados Integrados em Engenharia do Ambiente (MIEA) e em Bioengenharia (MIB) da FEUP. Relativamente aos cursos de 3º ciclo, o DEQ é responsável pelo Programa Doutoral em Engenharia Química e Biológica (PDEQB), pelo Programa Doutoral em Engenharia da Refinação, Petroquímica e Química (PDERPQ) e colabora no Programa Doutoral em Engenharia do Ambiente (PDEA) – ver Figura 1.4. Para assegurar esta atividade, o DEQ conta com 36 docentes permanentes e o apoio de 18 funcionários técnicos e administrativos (Figura 1.5). A maioria dos docentes são investigadores do DEQ exercendo a sua atividade de investigação no âmbito de Unidades de Investigação e Desenvolvimento da FCT, 4 das quais sediadas na FEUP (CEFT, LCM, LEPABE e LSRE – Figura 1.4). Destas unidades, o LSRE e o LCM têm em parceria o estatuto de Laboratório Associado. Os 18 investigadores do DEQ, entre os quais, 4 principais e 12 auxiliares, deram um contributo importante à atividade de investigação desenvolvida no DEQ, para além de colaborarem nas atividades de ensino.

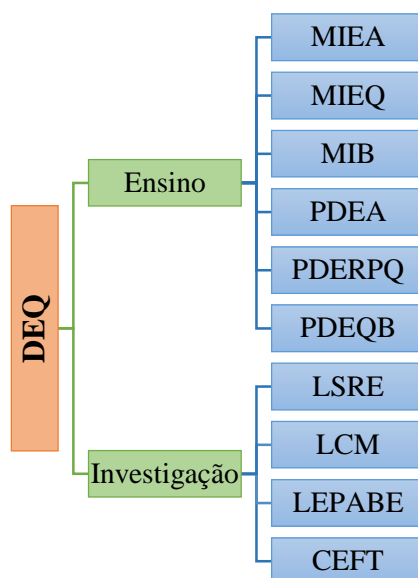


Figura 1.4 - Esquema representativo do Departamento de Engenharia Química.

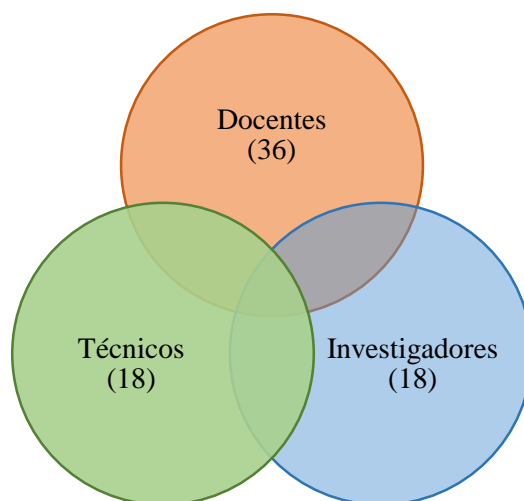


Figura 1.5 - Recursos humanos do Departamento de Engenharia Química.

Como técnica superior no DEQ desenvolvi várias atividades até à presente data que se podem distribuir por 7 grupos:

- I. Colaboração com os docentes no apoio às aulas laboratoriais das unidades curriculares Laboratórios Integrados I, Microbiologia Geral, Bioquímica Microbiana, Engenharia de Fermentações, Enzimática e de Proteínas, Tecnologia Ambiental e Alimentar, Ciências Biológicas, Microbiologia Ambiental e Laboratórios de Ciências do Ambiente I e III, pertencentes aos Mestrados Integrados de Engenharia Química, de Engenharia do Ambiente e Bioengenharia. As aulas laboratoriais, atualmente, funcionam nos laboratórios de Tecnologias, de Microbiologia e Biologia Celular e Molecular.
- II. Realização de trabalhos para as aulas práticas acima mencionadas, com vista a elaboração de novos protocolos e/ou alteração dos já existentes.
- III. Realização de trabalhos para o exterior, designadamente avaliação da qualidade microbiológica de águas para consumo humano, de águas superficiais e marinhas (em zonas balneares) de modo a verificar o cumprimento com a legislação vigente.
- IV. Apoio aos estudantes que estão a realizar as suas dissertações, no âmbito do mestrado integrado, no Laboratório de Projetos.

- V. Sempre que solicitado e/ou necessário apoio à investigação dos alunos que realizam a tese de doutoramento nos diferentes programas doutorais (PDEQB, PDEA e PDERPQ).

- VI. Orientação de estagiários oriundos de cursos técnico/profissionais de escolas secundárias.

- VII. Apoio a iniciativas realizadas pela FEUP a nível do DEQ nomeadamente, Universidade Júnior, Mostra da UP, visitas e relações com o ensino secundário e Semana Profissão Engenheiro.

1.2. Competências Adquiridas

A licenciatura na Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto e o Curso de Especialização na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, ambas em Engenharia do Ambiente, permitiram-me encarar o mercado de trabalho de forma confiante e abrir portas a novos desafios.

Os conhecimentos adquiridos na formação académica, a realização de formações complementares e a experiência adquirida anteriormente foram cruciais para o bom desempenho das funções assumidas atualmente na minha atividade profissional.

Embora a dissertação se foque unicamente no meu percurso na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, não posso deixar de referir a minha passagem pelo IDIT (Instituto de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica), sito em Santa Maria da Feira, onde participei na elaboração de diagnósticos ambientais em empresas na área da cortiça, o meu primeiro contacto com o mundo fora do meio académico, que me permitiu aplicar na prática o que havia aprendido no decorrer das licenciatura. Este projeto decorreu de junho-julho a outubro de 1998.

No mesmo ano inscrevi-me no programa Jovens Técnicos para a Indústria (JTI) - vertente energia, que consistiu numa parte teórica (2 meses) e num estágio de 9 meses na empresa Estamparia Têxtil Adalberto Pinto da Silva, Lda em Vila das Aves, onde permaneci de janeiro a setembro de 1999. Embora a minha prestação na empresa fosse essencialmente na área da energia, nomeadamente o estudo do consumo energético de alguns equipamentos utilizados no setor têxtil, foi-me dada a oportunidade de utilizar os conhecimentos que adquiri com a minha formação em Engenharia do Ambiente e implementar algumas medidas “amigas do ambiente”.

Adicionalmente, e em simultâneo ao meu trabalho na FEUP, elaborei o Plano de Gestão Ambiental e fiz o acompanhamento a nível da gestão ambiental de uma empreitada denominada “Avenida Marginal do Parque da Cidade do Porto” ao serviço da empresa Construtora do Tâmega, S.A. Também elaborei o Plano de Gestão Ambiental da empreitada referida e de uma outra denominada “Elevador dos Guindais”. Este trabalho surgiu no âmbito do projeto “Porto 2001”.

Na FEUP, tive a oportunidade de colocar em prática vários conceitos que adquiri com a minha licenciatura em Engenharia do Ambiente. Frequentei a pós-graduação em

Engenharia do Ambiente (ano letivo 2000/01), nomeadamente o ramo de especialização em Tratamento de Águas e Águas Residuais. Fiz várias análises de águas nomeadamente determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos e a comparação dos resultados obtidos nas referidas caracterizações com a legislação vigente. Realizei, à escala piloto, e no âmbito das disciplinas que apoio a nível do laboratório, tratamentos tais como coagulação/floculação, flutuação, adsorção em carvão activado e oxidação com reagente de Fenton.

O facto de atualmente trabalhar na área da microbiologia e bioengenharia permitiu-me aperfeiçoar o meu conhecimento sobre microrganismos possibilitando a sua aplicação a nível dos tratamentos biológicos, por exemplo.

Ao longo do meu percurso profissional, tive a oportunidade de valorizar o trabalho em equipa, o relacionamento interpessoal, a coordenação de atividades e a gestão de pequenos conflitos. Toda esta aprendizagem não advém somente da formação académica mas também da experiência, integração e predisposição de saber fazer.

O apoio ao ensino permitiu a aquisição de competências pedagógicas uma vez que tenho que transmitir conhecimentos e orientar os alunos nos trabalhos práticos e avaliá-los conjuntamente com os docentes das disciplinas.

Com a experiência adquiri a capacidade de responder a problemas e situações novas que possam surgir e cumpro com empenho os objetivos que me vão sendo propostos.

2. Trabalho Desenvolvido

2.1. Apoio ao Ensino

A minha principal função como Técnica Superior da FEUP é o apoio ao ensino, nomeadamente o apoio às aulas laboratoriais que decorrem no DEQ. Como apoio ao ensino entende-se toda a logística na fase de preparação da aula, durante o seu decurso e após terminar, bem como a gestão do laboratório.

Desde 1999, ano em que iniciei funções no DEQ, até hoje passei por diversos laboratórios, entre os quais laboratórios de química, química-física, microbiologia e ambiente, este último onde me senti mais à vontade e pude praticar e aperfeiçoar técnicas e métodos analíticos aprendidos durante a minha licenciatura.

Neste laboratório apoiei as disciplinas mais ligadas à área do ambiente onde eram realizados várias determinações físico-químicas que permitem avaliar a qualidade das águas tais como: sólidos totais (suspensos e dissolvidos), sólidos voláteis e sedimentáveis, nitritos, nitratos, azoto amoniacal (N amoniacal) e Kjeldahl (NTK), óleos e gorduras, detergentes, sulfatos, cloretos, dureza, alcalinidade, turvação, cor, carência química de oxigénio (CQO), carência bioquímica de oxigénio (CBO₅), carbono orgânico total (COT), fósforo total e dissolvido, metais (espectrometria de absorção atómica), entre outros. Tive também a oportunidade de testar processos de tratamento de águas e águas residuais: coagulação/floculação, flutuação, adsorção em carvão activado e oxidação com reagente de Fenton.

No que se refere aos processos de tratamento estes tinham como principal objetivo promover o conhecimento dos alunos e fornecer-lhes exemplos de aplicação das referidas tecnologias, nomeadamente:

- Coagulação/Floculação – tratamento de um efluente têxtil permitindo a remoção de cor e matéria orgânica através da adição de um sal de alumínio (coagulante) que permite a destabilização das partículas coloidais promovendo a aglomeração destas em partículas com maior dimensão através da adição de um floculante (Figura 2.1).



Figura 2.1 – Fotografia representativa do tratamento do efluente de tingimento têxtil por coagulação/floculação.

- Flutuação – remoção de sólidos em suspensão de um efluente da indústria do papel através da injeção de ar na água residual sob pressão (Flutuação por ar dissolvido) seguida de descompressão, fazendo com que as partículas recobertas com microbolhas de ar fossem arrastadas para a superfície (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Fotografia representativa do tratamento do efluente da indústria do papel por flutuação.

- Adsorção – consiste na adesão de um composto modelo (fenol) numa matriz sólida porosa, no caso, carvão ativado (Figura 2.3).

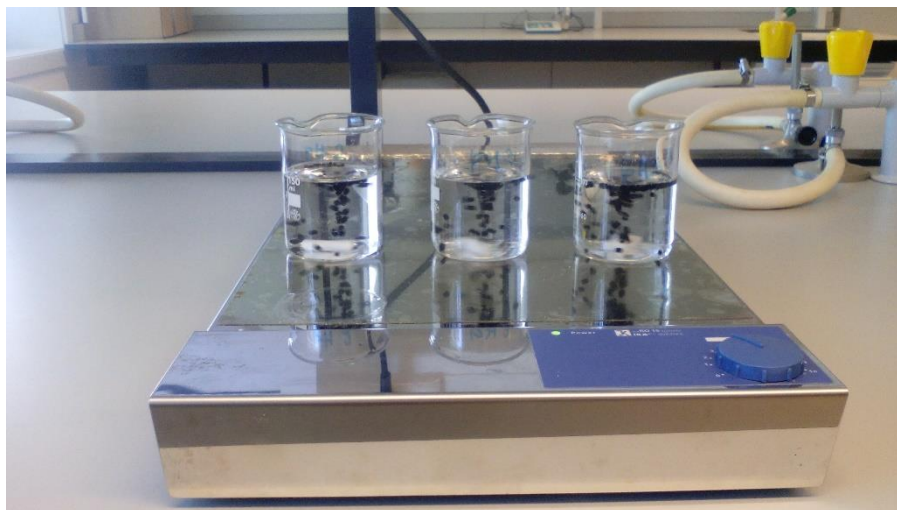


Figura 2.3 - Fotografia representativa da remoção do fenol por adsorção.

- Oxidação avançada com reagente de Fenton – remoção de cor e matéria orgânica por oxidação com radical hidroxilo gerado pela decomposição catalítica do peróxido de hidrogénio em meio ácido na presença do catalizador ião ferroso (Figura 2.4).

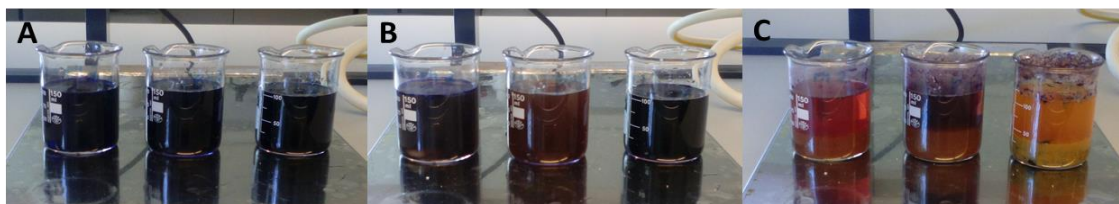


Figura 2.4 – Fotografia representativa do tratamento da água residual gerada na indústria de tingimento têxtil por processo oxidativo avançado de Fenton: A- Efluente a tratar, B- Início da reação, C- Após tratamento.

Atualmente dou apoio nos laboratórios de Tecnologias, de Microbiologia e Biologia Celular e Molecular, dos quais, até ao ano anterior fui principal responsável, dividindo neste momento a responsabilidade com uma colega, também ela Técnica Superior. Para além de duas Técnicas Superiores os laboratórios contam também com uma Assistente Técnica que presta todo o apoio necessário.

A minha função passa por gerir o laboratório como um todo, incluindo gestão de bens (equipamentos, reagentes, ...) e serviços.

Semestralmente, e se possível antes do início das aulas laboratoriais, é feito um levantamento das necessidades a nível dos reagentes e/ou meios e material para que as aulas laboratoriais decorram sem problemas, prevendo eventuais atrasos e imprevistos que possam surgir. É efetuada uma consulta prévia a algumas empresas e depois de analisados os vários orçamentos recebidos é solicitada a abertura de um PAD (Pedido de Autorização de Despesa) ao serviço de contabilidade da FEUP e efetuada a encomenda logo que a despesa tenha sido autorizada.

Todos os equipamentos existentes nos laboratórios possuem manuais de utilização rápida com as instruções essenciais para o seu funcionamento, documentos que fui elaborando à medida que se foram adquirindo os equipamentos (ver ponto I do anexo). Também é realizado o controlo da utilização do equipamento com folhas de registo; uma para a marcação (em algum equipamento) e uma para o registo de utilização, em que o utilizador regista a utilização e, se for o caso, a ocorrência de algum erro.

No final de cada ano é efetuado um relatório com a percentagem de utilização de algumas peças de equipamento como as autoclaves, a centrífuga de alta velocidade, o leitor de microplacas e o microscópio óptico com aquisição de imagem.

Em caso de avaria de algum equipamento, recorremos à percentagem de utilização por parte de cada utilizador e imputamos os custos associados para liquidar a fatura referente ao arranjo e/ou manutenção do referido equipamento. No ponto II do anexo apresento os gráficos com o tratamento dos referidos dados.

Os laboratórios nos quais estou inserida suportam aulas laboratoriais que integram os cursos de Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente (MIEA), Engenharia Química (MIEQ) e Bioengenharia (MIB) (ver Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Unidades curriculares lecionadas nos laboratórios de Tecnologias, de Microbiologia e Biologia Celular e Molecular

Cursos	Unidades Curriculares
MIEA	Microbiologia Ambiental Laboratórios de Ciências do Ambiente I* Laboratórios de Ciências do Ambiente III
MIEQ	Ciências Biológicas Bioquímica Microbiana Engenharia das Fermentações Engenharia Enzimática Engenharia de Proteínas
MIB	Laboratórios Integrados I* Laboratórios Integrados III** Microbiologia Geral Bioquímica Microbiana Engenharia das Fermentações Engenharia Enzimática Engenharia de Proteínas Tecnologia Ambiental Tecnologia Alimentar

* - Terminou no ano letivo 2012/2013

** - Substituída por Microbiologia Geral

As disciplinas de Laboratórios de Ciências do Ambiente I e Laboratórios Integrados I deixaram de ser lecionadas nos laboratórios atrás referidos devido a recentes alterações nos planos de estudos dos diferentes cursos.

As aulas laboratoriais são dadas pelo professor responsável pela unidade curricular em questão, encontrando-me sempre presente para apoio ao professor.

Para o bom funcionamento das aulas laboratoriais há toda uma logística na sua preparação. Cabe-nos a nós, Técnicas, a responsabilidade dessa tarefa. No dia da aula as experiências estão montadas por grupos nas bancadas, prontas para os alunos iniciarem os seus trabalhos sob a orientação do professor e do técnico.

Uma das minhas funções é a alteração/melhoria dos trabalhos experimentais sugeridos pelo professor responsável no âmbito da unidade curricular a que está afeto. Todos os trabalhos são testados e, no caso do trabalho ser novo, são muitas vezes sugeridas alterações para melhorar os objetivos do trabalho e/ou interesse para o aluno.

Neste contexto foi-me proposto a elaboração de alguns protocolos para serem utilizados nas aulas e/ou em análises bacteriológicas de águas em resposta a serviços externos à FEUP que constam no ponto III do anexo.

Na tabela que se segue apresentam-se de forma esquematizada a lista dos protocolos que elaborei e as unidades curriculares em que são utilizados.

Tabela 2.2 - Trabalhos realizados e unidades curriculares interligadas

Unidades Curriculares	Título do trabalho
Laboratório de Ciências do Ambiente III	Water quality – detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria (ISO 9308-1)
	Water quality – detection and enumeration of intestinal enterococci (ISO 7899-2)
Tecnologia Alimentar	Secagem de maçã
	Caracterização físico-química e reológica de iogurtes
Bioquímica Microbiana	Teste da rezasurina como indicador da qualidade do leite
Microbiologia Geral	PNA-FISH para identificação de um microrganismo

Uma das fundamentais preocupações é transmitir aos alunos os conceitos básicos de microbiologia e fornecer-lhes as técnicas principais que lhes permitam explorar o universo da microbiologia e interligar esta disciplina com as respetivas áreas de estudo.

De seguida apresenta-se de forma mais clara e resumida o objetivo dos trabalhos experimentais realizados em cada unidade curricular.

2.1.1. Microbiologia Ambiental

Sendo uma disciplina do primeiro ano do curso de MIEA pretende-se que os alunos tomem contacto com as técnicas básicas da microbiologia e adquiram conhecimentos fundamentais para serem capazes de os utilizar na formulação, resolução e discussão de problemas ambientais.

Os engenheiros do ambiente têm vindo a utilizar microrganismos para descontaminar locais poluídos. Adicionalmente, os engenheiros do ambiente implementam metodologias que evitam a contaminação com organismos nocivos.

Estas aulas fornecem aos alunos um conjunto de ferramentas que lhes permitem resolver diversas questões ambientais.

Desde a primeira aula são dadas a conhecer as regras gerais de conduta e segurança num laboratório de microbiologia, não esquecendo que todas as culturas devem ser consideradas como potencialmente perigosas e tratadas como tal. Os alunos trabalham com microrganismos que poderão ser patogénicos para o homem, sendo por isso necessário tomar precauções e cumprir regras de assepsia de modo a evitar a sua própria contaminação e a dos outros.

De forma resumida é-lhes explicado que meios de cultura existem ao nosso dispor no mercado, como se pode verificar na tabela que se segue.

Tabela 2.3 - Classificação dos meios de cultura

Meios de cultura	
Estado físico	Líquido
	Sólido
	Semi-sólido
Composição	Definidos
	Complexos
Aplicação	Gerais
	Diferenciais
	Seletivos

Outro ponto que é focado são os métodos de esterilização mais comuns (Figura 2.5).

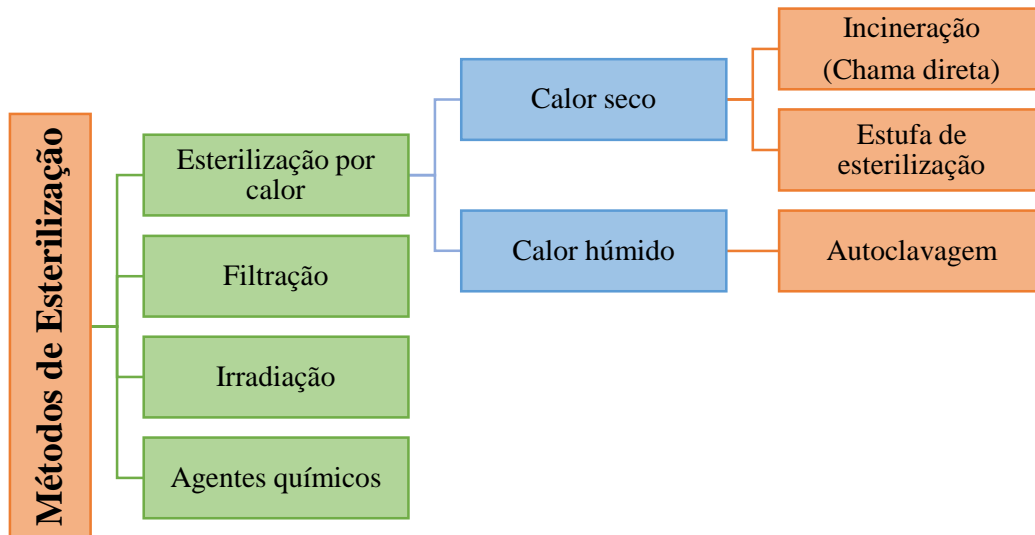


Figura 2.5 - Métodos de esterilização.

Outro conceito muito importante e que também é explicado é o isolamento e purificação de culturas. Na natureza é possível encontrar microrganismos em todos os locais, incluindo aqueles que apresentam características extremas para o Homem. A obtenção de culturas puras é uma constante necessidade de um microbiólogo. Qualquer amostra recolhida, seja um solo, uma água, ou mesmo um alimento vem carregada com vários tipos de microrganismos. Para poder caracterizar um determinado tipo de microrganismo presente nessa amostra é necessário separá-lo dos restantes. É então necessário isolá-lo de modo a obter uma cultura pura.

A base deste trabalho é precisamente o isolamento, purificação e identificação de microrganismos. Para isso e ao longo de várias aulas os alunos vão avaliar uma amostra e fazer todos os ensaios necessários.

A cada grupo de alunos é fornecida uma suspensão contendo microrganismos que numa primeira fase terão que fazer a enumeração dos microrganismos heterotróficos totais, utilizando a técnica do espalhamento em meio geral e a inoculação em meios seletivos utilizando a técnica do estriamento no caso dos meios sólidos.

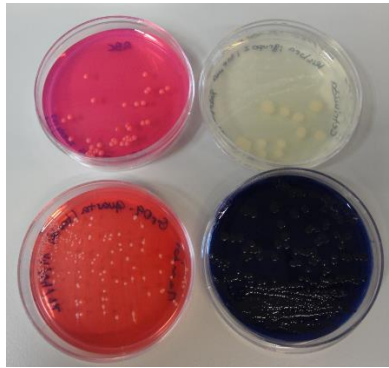


Figura 2.6 - Exemplos de meios seletivos utilizados para isolar diferentes microrganismos. Rose Bengal Chloramphenicol Agar – *Rhodotorula rubra*; Cetrimide Agar – *Pseudomonas fluorescens*; Mannitol Salt Phenol-Red Agar - *Staphylococcus epidermidis*; mfc Agar - *Escherichia coli*.

O passo seguinte é propagar em meio sólido geral os microrganismos isolados.

Os alunos avaliam as colónias obtidas caracterizando-as quanto à forma, elevação e margem.

Após a caracterização colonial, segue-se a caracterização da morfologia celular de um dos microrganismos isolados. É então efetuada a preparação de um esfregaço para efetuar a coloração de gram e outro para a coloração de endósporos (Figuras 2.7 e 2.8).

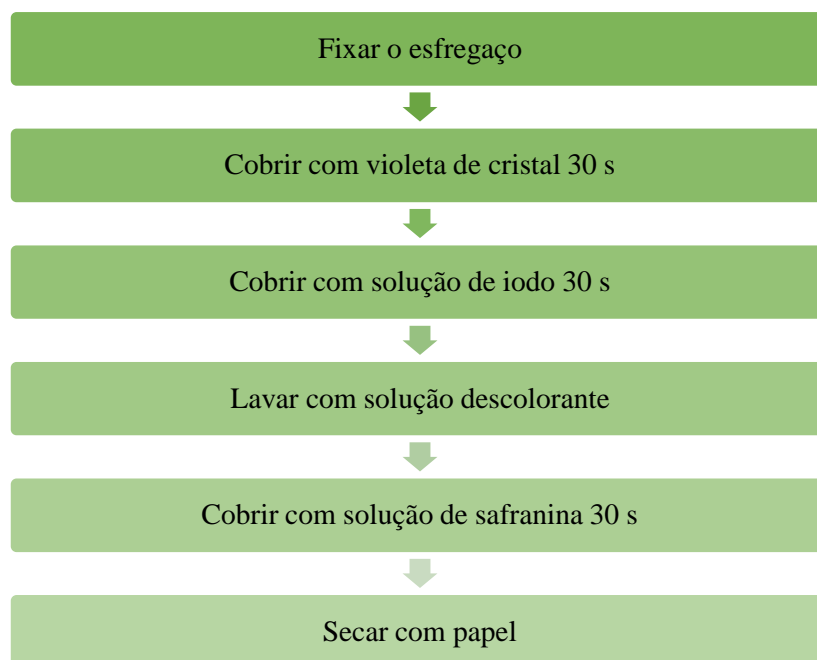


Figura 2.7 - Técnica de coloração de Gram.

Convém referir que entre cada passo é necessário lavar a lâmina com água.

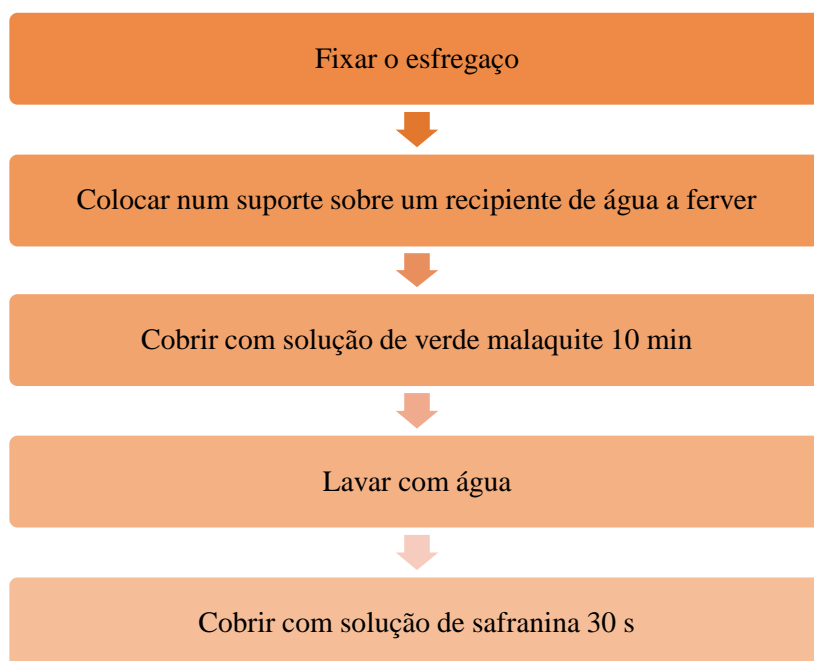


Figura 2.8 – Técnica de coloração de endósporos.

De seguida é feita a caracterização fisiológica dos isolados através de um conjunto de pequenos testes:

- Teste da catalase
- Teste da amilase
- Teste de Oxidação/Fermentação (O/F)



Figura 2.9 - Teste O/F. Meios antes e depois de inoculados.

- Teste da oxidase

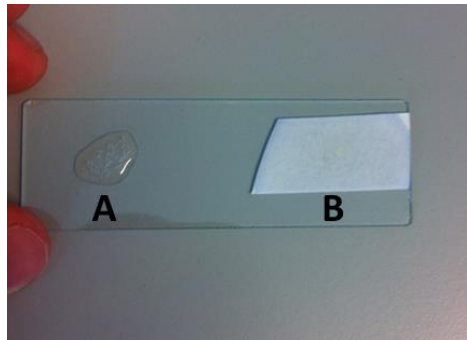


Figura 2.10 - Teste da catalase positivo (A) e teste da oxidase negativo (B).

- Avaliação do potencial de cada um dos microrganismos isolados para descontaminar ambientes poluídos

Cada grupo avalia a capacidade dos microrganismos para degradar poluentes ambientais. Utiliza-se o nitrato, uma vez que pode ser usado como aceitador final de elétrons de microrganismos com respiração anaeróbia (desnitrificantes) e o herbicida molinato, porque existe um organismo capaz de usar o pesticida como fonte única de carbono e azoto.

Finalmente os alunos estudam o efeito de agentes antimicrobianos (físicos e químicos) sobre o crescimento microbiano. Utilizam agentes antissépticos e agentes desinfetantes, como o observado na figura abaixo.

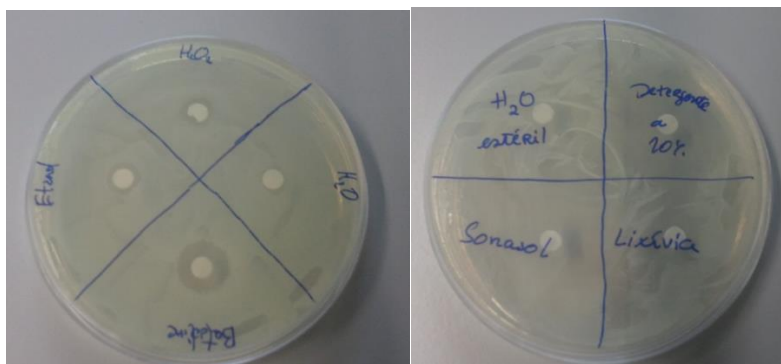


Figura 2.11 - Resultados de um antibiograma realizado pelos alunos.

2.1.2. Laboratório de Ciências do Ambiente III

No âmbito desta unidade curricular as aulas laboratoriais são estruturadas de modo a conciliar os conceitos teóricos com a prática, permitindo a consolidação de conhecimentos adquiridos noutras unidades curriculares. Os alunos tem aulas em três laboratórios diferentes, de áreas diferentes mas que se interligam.

Assim sendo, no laboratório onde me encontro os alunos aprendem a fazer análise de qualidade bacteriológica de águas de diferentes origens pelo método de filtração por membrana, o que lhes permite fazer a caracterização microbiológica de efluentes.

No caso específico é efetuada a deteção e enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes, respeitando a norma ISO 9308-1, a deteção e enumeração de enterococos intestinais (ISO 7899-2) e a enumeração de microrganismos viáveis – nº de colónias a 22 °C e a 37 °C (EN ISO 6222), estando todas as normas de acordo com o Decreto-Lei 306/2007, de 27 de Agosto.

Normalmente é fornecida uma água contaminada no laboratório, para garantir que os alunos visualizam as colónias típicas e atípicas para cada parâmetro analisado. É também dada a possibilidade de os alunos trazerem a sua própria amostra de água.

O método de filtração por membrana é um dos métodos analíticos de referência para a enumeração dos indicadores de poluição (Figura 2.12), sendo por isso utilizado nas aulas.



Figura 2.12 - Análise bacteriológica de águas pela técnica das membranas filtrantes.

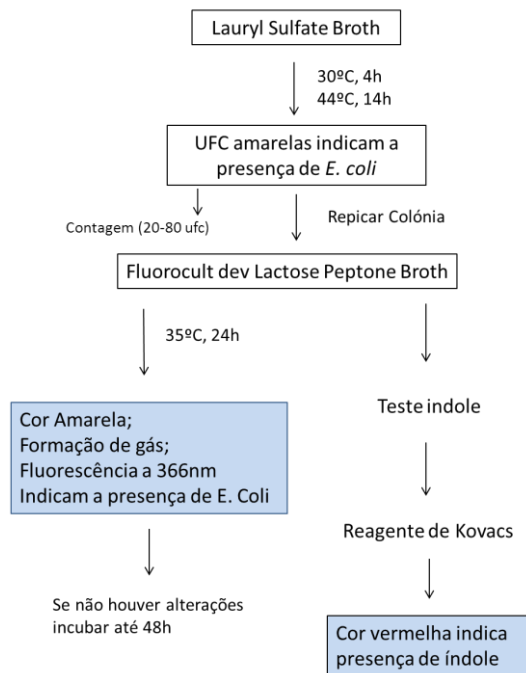
***Escherichia coli* (adaptação da ISO 9308-1)**

Figura 2.13 - Esquema do método de enumeração da *Escherichia coli* e bactérias coliformes.

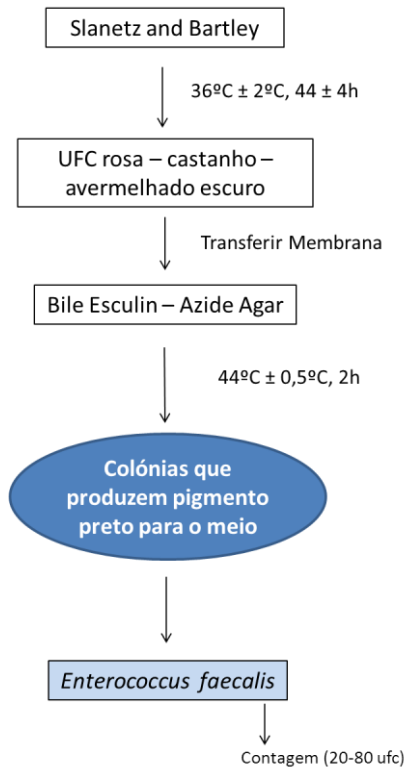
Enterococos (ISO 7899-2)

Figura 2.14 - Esquema do método de enumeração dos enterococos.

Uma outra vertente das aulas práticas de LCA III é o estudo da biodegradabilidade de uma água residual e o efeito da presença de um pesticida, o molinato.

O uso intensivo de pesticidas na agricultura tem vindo a provocar a contaminação de solos e águas superficiais e de aquíferos. A maioria dos pesticidas são moléculas orgânicas sintetizadas pelo Homem, com o objetivo final de eliminar pragas (fungos, ervas daninhas, insectos, etc). Assim, por natureza, estes compostos orgânicos são tóxicos, e para além dos organismos alvo, podem afectar outros com consequências nefastas para os ecossistemas e para a saúde de humanos e de outros animais.

Uma das formas de evitar a contaminação ambiental pelos pesticidas é utilizar microrganismos capazes de os degradarem, em processos denominados por Biorremediação. Existem vários métodos para avaliar a eficácia do tratamento biológico.

Neste trabalho usa-se a Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), e uma modificação do método Microtox para comparar a capacidade de duas culturas microbianas mistas para degradar o molinato, um herbicida usado mundialmente na eliminação de ervas daninhas em culturas de arroz.

O teste Microtox foi desenvolvido para avaliar a toxicidade de uma dada substância (por ex. compostos orgânicos e os seus produtos de degradação química e/ou biológica). Este método baseia-se no efeito que essa substância tem na atividade de uma bactéria marinha luminescente (*Vibrio fischeri*). Assim, na presença de uma substância tóxica, as células desta bactéria emitem menos luz.

2.1.3. Ciências Biológicas

O objetivo desta unidade curricular é proporcionar um contacto com as técnicas básicas de microbiologia de modo a potenciar o uso de sistemas biológicos para fazer ou modificar produtos e processos industriais e ambientais, dotando os alunos da capacidade de manipularem microrganismos, fazerem a sua caracterização, realizarem crescimentos e utilizarem os microrganismos em aplicações biotecnológicas.

Este módulo é constituído por três aulas práticas. Na primeira aula o objetivo é a inoculação de culturas mistas em meios gerais, onde os alunos inoculam um meio líquido a partir de uma cultura mista em meio líquido e fazem diluição de uma amostra seguida de espalhamento em meio sólido. É fornecida aos alunos uma cultura com uma mistura de três microrganismos conhecidos, designadamente a *Escherichia coli*, a *Pseudomonas fluorescens* e o *Staphylococcus aureus*.

Na segunda aula fazem a inoculação de microrganismos em meio sólido geral utilizando a técnica de estriamento, inoculação em meio seletivo para identificarem os microrganismos e coloração de gram.



Figura 2.15 - Técnicas de espalhamento e estriamento.

A última aula é um crescimento bacteriano em sistema fechado (*batch*).

O crescimento bacteriano pode ser entendido como o aumento do número de células numa determinada cultura. Este processo envolve na maioria das bactérias o aumento da massa celular, do número de ribossomas, duplicação do material genético, síntese de parede celular e membrana citoplasmática e divisão celular.

As bactérias estudadas dividem-se através de um processo chamado fissão binária e essa divisão pode ser acompanhada medindo a massa celular ou medindo o número de células. Na aula é utilizada a medição da turbidez (densidade óptica) da suspensão, que é uma técnica indireta de medição da massa celular.

A medição da turbidez da suspensão analisa a quantidade de luz dispersa pelos microrganismos que constituem a suspensão celular. A densidade óptica de uma suspensão celular é diretamente proporcional ao número de células (em suspensões diluídas) e pode ser correlacionada com a massa de células ou número de células após construção de uma curva de calibração. Este método é rápido, simples e não destrói a amostra.

Quando um meio de cultura fresco contendo todos os nutrientes necessários essenciais é inoculado com uma estirpe bacteriana e é incubado em condições propícias ao seu crescimento, obtém-se a evolução do número de células ao longo do tempo – curva de crescimento.

Na Figura 2.16 vem ilustrada uma curva de crescimento teórica, onde é possível visualizar as diferentes fases que a constituem.

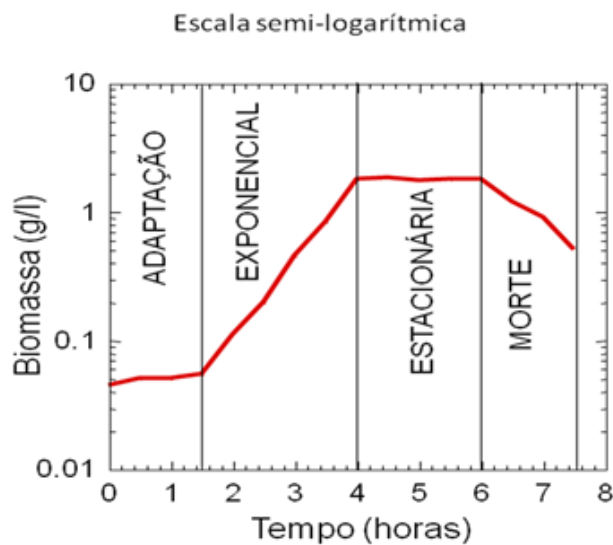


Figura 2.16 - Curva de crescimento teórica.

A título de exemplo, é possível visualizar na Figura 2.17 as curvas de crescimento obtidas pelos alunos de CB do ano lectivo 2014/2015.

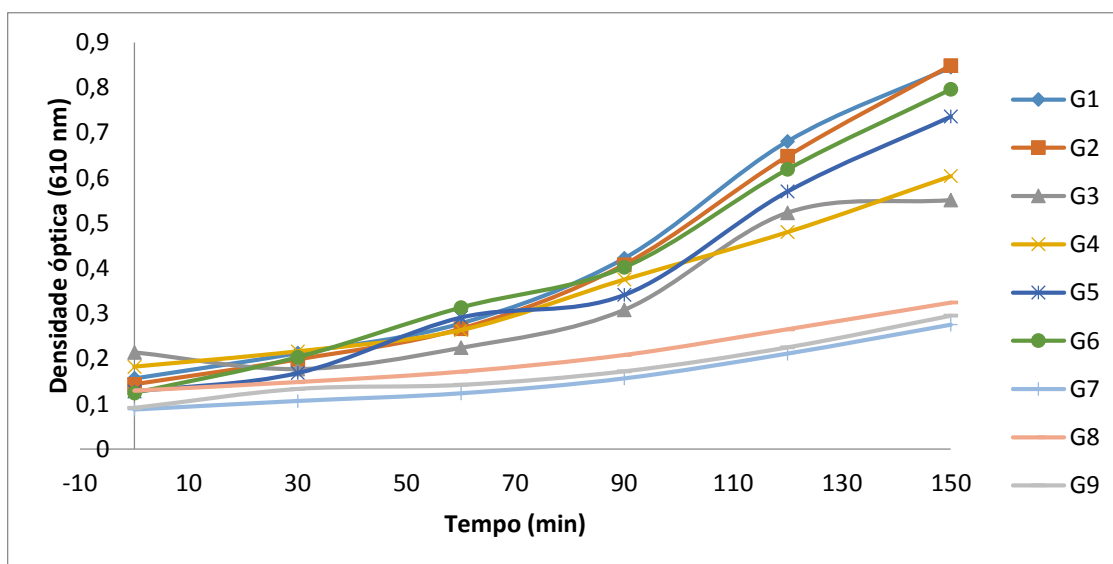


Figura 2.17 - Curvas de crescimento obtidas pelos alunos.

Cada linha representa a curva de crescimento bacteriano obtida pelo respetivo grupo.

Foram utilizados três microrganismos diferentes, a *Escherichia coli*, a *Pseudomonas fluorescens* e o *Staphylococcus aureus* e dois meios de cultura diferentes, o meio NB e o meio M9 para os alunos poderem comparar os valores obtidos entre grupos.

2.1.4. Bioquímica Microbiana

Esta unidade curricular fornece uma explicação abrangente sobre o impacto das vias metabólicas dos microrganismos em várias áreas da atividade humana. São abordados conceitos fundamentais para a operação de reatores biológicos ou de outros processos microbiológicos, importantes na engenharia alimentar e ambiental. Promove-se também a visão crítica sobre vantagens e limitações da aplicação de microrganismos em diferentes processos.

Assim sendo, ao longo das aulas laboratoriais os alunos produzem iogurte e fazem a sua caracterização (pH, proporção de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*). É também analisada a sobrevivência de microrganismos potencialmente patogénicos em produtos fermentados (iogurte), comparando com o seu desenvolvimento no alimento não fermentado (leite).

A produção do iogurte é efectuada através da fermentação homoláctica do leite utilizando uma mistura simbiótica de duas bactérias do ácido láctico: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*.

Nas aulas os alunos começam por fazer a caracterização de um iogurte natural comercial determinando a razão *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus*, fazendo a medição do pH e verificando a relação peso/volume.

Para determinar a razão dos microrganismos é utilizado o meio ST para enumerar o *Streptococcus thermophilus* e o meio LBA para enumerar o *Lactobacillus bulgaricus*.

Depois de isolarem e propagarem os microrganismos passam a biomassa obtida para tubos com água estéril e congelam para posteriormente liofilizarem as células de cada microrganismo para usarem como inóculo na produção de iogurte.

Antes da produção do iogurte, é necessário testar a qualidade do leite utilizado. Para esse efeito é realizado o teste da resazurina.

O teste da resazurina é um método que estima o teor bacteriano do leite graças à correlação existente entre o número de bactérias presentes e a mudança de cor do leite ao

fim de um período de tempo. Este método baseia-se no fato das bactérias consumirem O_2 do leite, através do seu processo respiratório, tendo como resultado a redução do corante. A resazurina apresenta uma coloração azul em leite de boa qualidade, o abaixamento do potencial de oxidação-redução do leite faz o corante apresentar uma coloração rosa.

A Figura 2.18 representa um esquema do teste da resazurina.

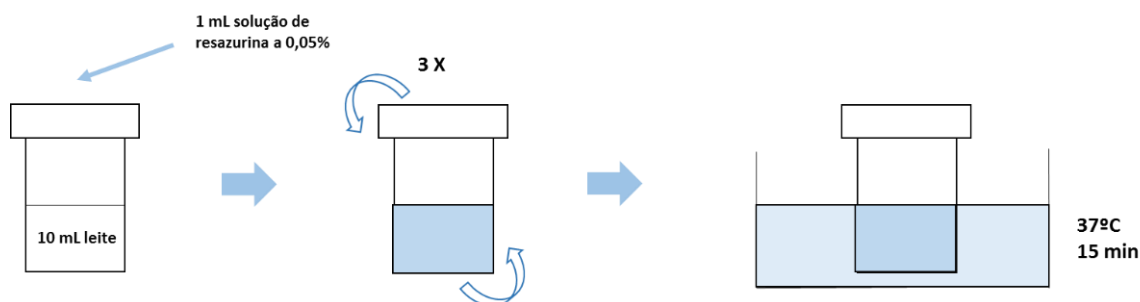


Figura 2.18 - Representação simplificada do teste da resazurina.

De seguida apresenta-se a tabela com os resultados do teste.

Tabela 2.4 - Resultados do teste da resazurina

Cor	Qualidade
Azul	Excelente
Roxo	Bom
Lavanda	Regular
Rosa	Mau
Branco	Péssimo

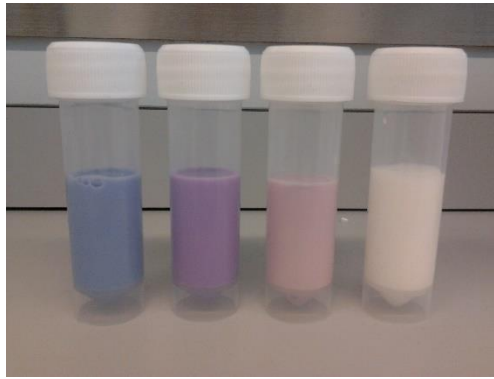


Figura 2.19 - Qualidade do leite – teste da resazurina.

Estão então reunidas as condições para cada grupo produzir o seu iogurte com algumas variações tais como inóculo com diferentes proporções de microrganismos, inóculo com iogurte comercial e contaminação do iogurte com uma suspensão de *Escherichia coli*.

Antes de colocarem os iogurtes a incubar é necessário retirar as amostras necessárias para enumerar os microrganismos presentes, ou seja, o *Streptococcus thermophilus*, o *Lactobacillus bulgaricus* e a *Escherichia coli*; para este último utiliza-se o meio m-Endo Les.

2.1.5. Engenharia das Fermentações

Pretende-se que os estudantes adquiram a capacidade de planejar, dimensionar e analisar a operação de reatores com células (em particular, microbianas) em suspensão e em agregados celulares (incluindo biomassa fixa). Esta unidade curricular também visa dotar os estudantes de conhecimentos de análise e dimensionamento de unidades complementares de processos fermentativos (agitação, arejamento e esterilização).

O programa da disciplina contempla a realização de três trabalhos distintos abaixo elencados:

- Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio em tanques agitados e arejados

Neste trabalho é efetuada a medição do coeficiente de transferência de oxigênio entre bolhas de ar e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação *batch* – método dinâmico, determinado o coeficiente global volumétrico de transferência de oxigênio e quantificada a sua correlação com a velocidade e caudal de arejamento através do método químico de oxidação do sulfito.

Para o método dinâmico os alunos deverão traçar as curvas de oxigênio dissolvido ao longo do tempo para as diferentes condições, determinar graficamente o dC_L/dt para cada valor de oxigênio dissolvido e determinar os valores de $\mu/YO_2.X$ e $K_L.a$.

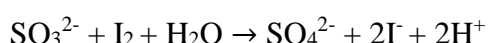
Em que:

$\frac{\mu}{YO_2}.X$ - taxa de consumo de oxigênio pelos microrganismos

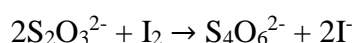
K_L - Coeficiente de transferência de oxigênio no meio líquido (m/h)

a - Área interfacial efetiva das bolhas /volume das bolhas de gás no meio (m^2/m^3)

O sulfito de sódio é determinado através duma titulação iodométrica por retorno, por adição de um excesso de solução de iodo, que reage com o sulfito de acordo com a equação:



O excesso de iodo é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio:



Este método envolve uma reação química rápida que consome o oxigênio, a oxidação do SO_3^{2-} a SO_4^{2-} . Como indicador do ponto final da titulação utiliza-se o amido, que passa de azul a incolor.



Figura 2.20 - Aplicação da técnica titulométrica para a determinação da taxa de transferência de oxigênio.

Para o método químico os alunos deverão calcular a variação da concentração de sulfito de sódio com o tempo para cada experiência realizada e calcular o K_L para as condições escolhidas.

- Cultura contínua de *Saccharomyces cerevisiae* em quimiostato – efeito da taxa de diluição

O objetivo deste trabalho é analisar o efeito da taxa de diluição no desempenho de um biorreator em contínuo para o crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao longo do tempo vai sendo avaliada a concentração de biomassa dentro do biorreator através da densidade óptica na corrente de saída e determinada a concentração de glicose pelo método dos açúcares redutores.

- Obtenção de Penicilina G por operação em *fed-batch*

As penicilinas são um grupo de antibióticos produzidos por um fungo do género *Penicillium*. Existem vários tipos de penicilina, sendo a penicilina G uma das mais notáveis. Após a sua descoberta, a penicilina rapidamente se popularizou devido à sua alta atividade antimicrobiana combinada com a sua baixa toxicidade para o ser humano.

Neste trabalho pretende-se produzir penicilina G utilizando uma estirpe de *Penicillium chrysogenum*, um fungo estritamente aeróbio, que cresce na forma de hifas

(filamentos longos e ramificados). A morfologia filamentosa do fungo faz com que o meio de cultura onde ele cresce apresente elevada viscosidade.

O trabalho é realizado em três etapas, na primeira faz-se o crescimento do fungo, segue-se a extração da penicilina G e por último são realizados testes de sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos.



Figura 2.21 - Inoculação de um biorreator para produção de Penicilina-G.

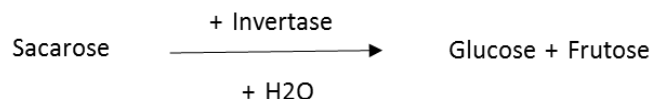
2.1.6. Engenharia Enzimática

Nesta unidade curricular pretende-se conferir aos alunos aptidões básicas para conceber, dimensionar e otimizar a operação de reatores enzimáticos em sistemas diversos; e consequentemente reforçar a sua proficiência no desenvolvimento e implementação de processos industriais de base biotecnológica incorporando tecnologia enzimática.

Nas aulas laboratoriais os alunos têm a oportunidade de realizar três trabalhos, sendo um deles um projeto aberto consistindo na elaboração de um protocolo experimental do estudo do potencial biocatalítico de uma enzima de utilização corrente.

- Determinação das constantes cinéticas da invertase em células livres e imobilizadas em alginato

Este trabalho tem por objetivo a determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise da sacarose pela invertase que é uma enzima intracelular:



São utilizadas células de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de invertase livre e imobilizadas num gel de alginato.

No final do trabalho os alunos calculam as constantes cinéticas e a atividade específica para a enzima livre e imobilizada, o fator de efetividade global para cada concentração de substrato e determinam o coeficiente de difusão médio.

- Determinação da concentração de penicilina G com recurso a um biossensor

Para a deteção e quantificação da penicilina recorre-se muitas vezes à aplicação de tecnologia enzimática e ao desenvolvimento de biossensores. O funcionamento dos biossensores baseia-se na ação conjunta de enzimas ou células imobilizadas e de um detetor analítico para o produto da reação biocatalizada que pode ser um eléctrodo de pH ou de potencial redox, por exemplo.

Um dos exemplos de combinação de enzimas com detetores electroquímicos é a reação de hidrólise catalizada pela enzima penicilina acilase na produção de ácido 6-aminopenicilâmico (6-APA). A produção do 6-APA tem importante interesse comercial pois é usado como precursor na produção de diversas penicilinas.

Neste trabalho a penicilina acilase será utilizada na construção de um biossensor. A enzima pode ser imobilizada num eléctrodo de pH (vidro), por adsorção e reticulação com glutaraldeído. A libertação do produto secundário da reação produz uma variação no pH que é detetada pelo eléctrodo, permitindo medir a atividade enzimática e a concentração de penicilina G em solução.



2.1.7. Engenharia de Proteínas

O objetivo desta unidade curricular é a produção, purificação e análise de uma proteína recombinante.

A necessidade de obter grandes quantidades de proteína para diferentes fins levou ao desenvolvimento de sistemas de produção de proteínas *in vivo*. A escolha de um determinado sistema de produção depende principalmente das características da proteína e do fim a que se destina. A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é o sistema de produção *in vivo* mais comum.

A expressão em *E. coli* é um método apropriado quando a proteína não requer modificações pós-translacionais complexas, permitindo a sua obtenção na forma solúvel ou em corpos de inclusão, em grande quantidade e com a estrutura correcta e consequentemente funcional.

A estratégia básica passa pela clonagem do gene correspondente num vector de expressão e a transformação das bactérias com esse vector. Quando se pretende produção de uma grande quantidade de proteína, pode utilizar-se um fermentador para crescer o microorganismo, seja ele uma bactéria ou levedura. O vector de expressão é em geral um plasmídeo no qual deve ser clonada a sequência do gene que se pretende expressar.

Um dos plasmídeos mais comuns é o pET, representado na Figura 2.22.

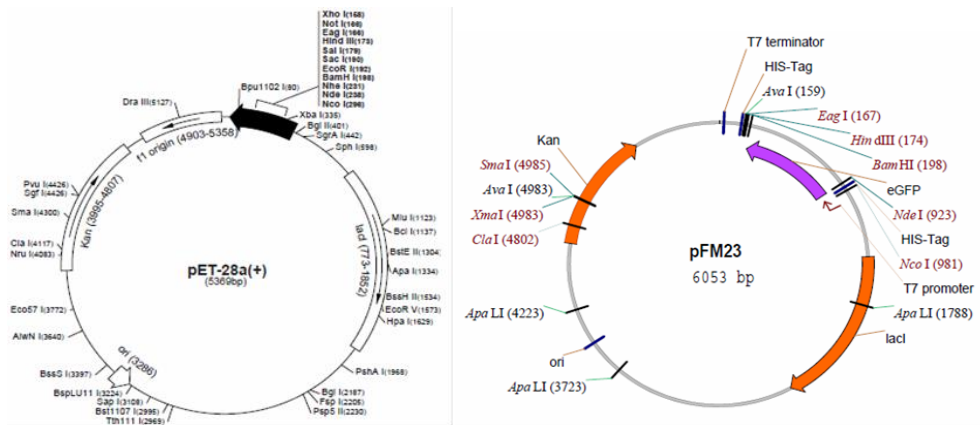


Figura 2.22 - Representação esquemática dos vetores de expressão pET-28a(+) e pFM23.

Neste trabalho, o vetor de expressão utilizado foi o pFM23, ilustrado na Figura 2.22, que teve como base o pET-28a.

Na expressão e purificação da proteína utiliza-se *Escherichia coli* JM109 com o plasmídeo pFM23, contendo o gene da eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Após indução com IPTG, as células contendo o produto são recolhidas por centrifugação e sonificadas. Ao sobrenadante deste sonificado aplica-se uma cromatografia por afinidade em resina Ni-NTA (His-Catch Metal Chelating Cellulose, Ni²⁺ Precharged, Bioline). A cromatografia de afinidade tem a desvantagem de contaminar a amostra com o composto que desloca a proteína que pode ser separado por diálise. O conteúdo cromatográfico é então colocado numa manga de diálise (Figura 2.23).

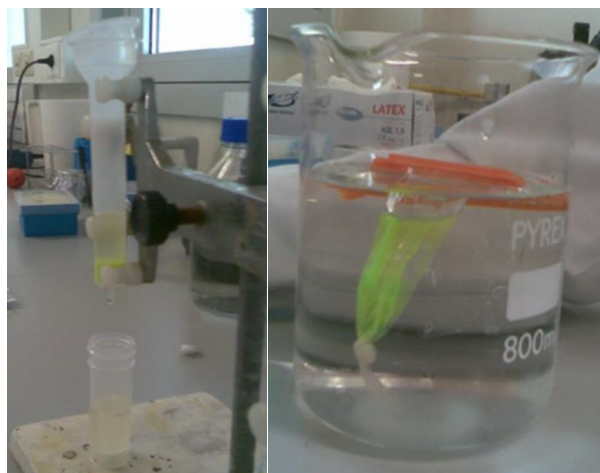


Figura 2.23 - Cromatografia por afinidade e processo de diálise.

As amostras recolhidas durante o processo de extracção e purificação são ensaiadas pelo método do BCA, para quantificação de proteína total, utilizando um kit comercial (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

As amostras são colocadas em placas de 96 poços, sendo incubadas a 37 °C por 30 min, com a placa protegida da luz. A absorvância é lida a 562 nm e 595 nm, num leitor de microplacas.

A quantificação da eGFP é efetuada por leitura de fluorescência das amostras em placa de 96 poços, com 200 µL por poço, excitação a 488 nm e detecção da resposta a 507 nm (Figura 2.24).

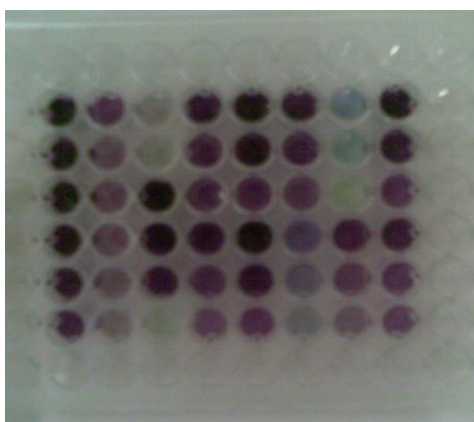


Figura 2.24 - Quantificação da proteína.

No final é efetuada a análise da eGFP com SDS-PAGE (Figura 2.25).

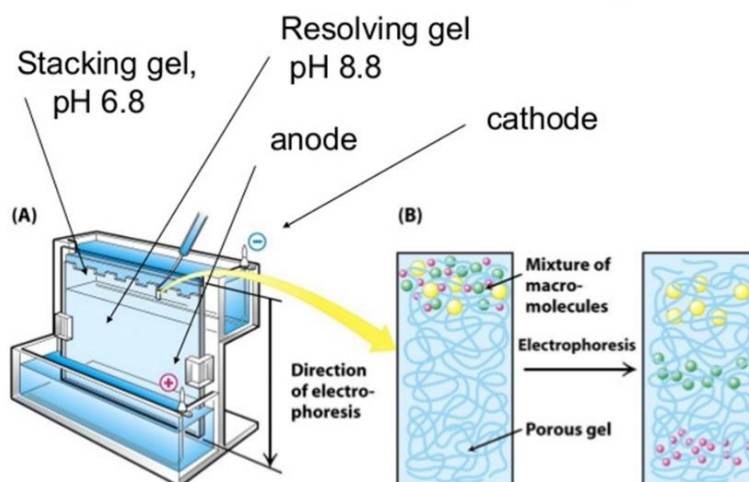


Figura 2.25 - Representação esquemática da cromatografia em gel SDS-PAGE.

Na Tabela 2.5 é possível visualizar a composição dos géis utilizados.

Tabela 2.5 - Composição dos geis de proteínas

Reagentes	Gel Resolvente	Gel de Empacotamento
30% Acrilamida/4% Bisacrilamida	3.76 mL	830 µL
1.5M Tris-HCl pH 8.8	3.75 mL	---
0.5M Tris-HCl pH 6.8	---	1.26 mL
10% m/v SDS	94 µL	50 µL
Água desionizada	1.58 mL	2.71 mL
TEMED	15 µL	10 µL
10% m/v APS	150 µL	50 µL

Convém evidenciar um truque utilizado na preparação do gel resolvente. O gel em polimerização é recoberto com butanol, para nivelar a sua fronteira, permitindo que o gel de empacotamento ao ser colocado sobre o gel resolvente tenha um limite bem definido. A função do butanol é reduzir a tensão superficial das interfaces gel-ar e gel-vidro, evitando que o gel forme um menisco.

Na Figura 2.26, é possível ver o exemplo de um gel obtido pelos alunos no ano letivo 2014/15.

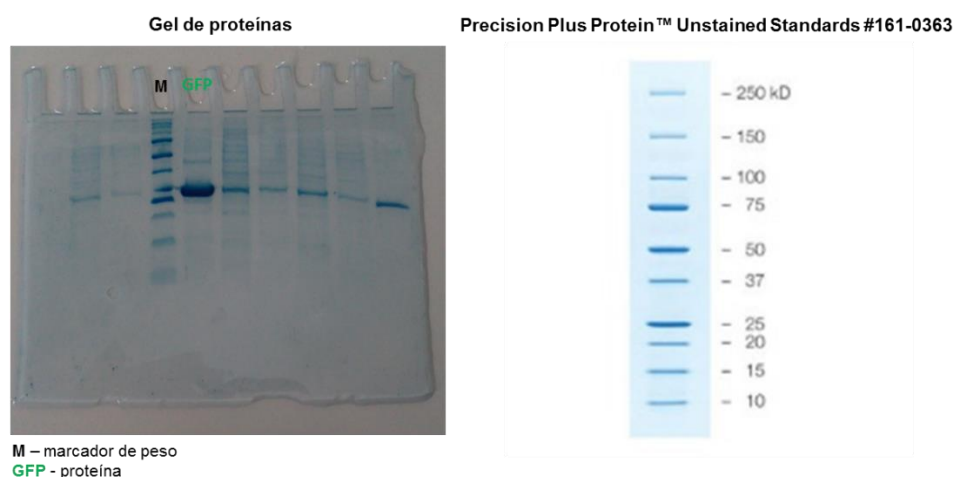


Figura 2.26 – Gel de proteínas e marcador de peso.

2.1.8. Microbiologia Geral

Nesta unidade curricular são apresentados aspetos fundamentais aplicados da Microbiologia Geral. Os trabalhos laboratoriais estão relacionados com a identificação de culturas de microrganismos por vários métodos microbiológicos e de biologia molecular.

Aos alunos é permitida a enumeração, isolamento e purificação de microrganismos presentes numa amostra. É efetuada a caracterização morfológica e fisiológica dos microrganismos e, simultaneamente, a amplificação e sequenciação de um marcador filogenético (gene rRNA 16S ou rRNA 18S) permitirá a identificação do microrganismo isolado. É também testado o efeito de agentes antimicrobianos sobre o crescimento do isolado e é desenhada uma sonda de PNA-FISH para sua identificação/quantificação.

Na prática os alunos na área da biologia molecular fazem:

- Extração de DNA total e eletroforese

Depois de observarem a cultura do isolado obtida em aulas anteriores e confirmado a sua pureza, a mesma é utilizada para extrair o DNA total e para caracterizar a sua morfologia celular.

O DNA é obtido por fervura (95 °C, 10 min) seguida de arrefecimento rápido em gelo (5 min).

A eletroforese do DNA total é efetuada em gel de agarose 0,7% e as amostras são preparadas misturando 2 µL de loading buffer (azul de bromofenol/glicerol) com 8 µL de amostra de DNA total e corre a 90 V durante 35 a 50 min.

As bandas de DNA são visualizadas colocando o gel num transiluminador.

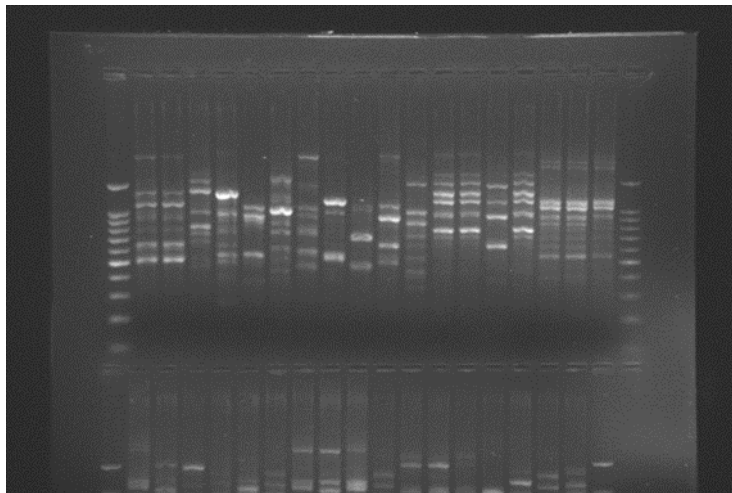


Figura 2.27 - Eletroforese em gel de agarose.

- Amplificação do gene rRNA 16S ou rRNA 18S - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Neste estudo são usados os primers 27 F (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA 3') e 1492R (5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (posição nucleótidos 27 e 1492 da estirpe referência *Escherichia coli*) e os primers 515F (5' GTGCCAAGCAGCCGCGGTAA 3') e 1209R (5' GGGCATCACAGACCTG 3') (posição nucleótidos 515 a 1209 da estirpe referência *Saccharomyces cerevisiae*), para amplificação do gene rRNA 16S e rRNA 18S, respetivamente. Assim, neste trabalho, é esperado um fragmento de 1500 pb e de 700 pb, para amplificação do gene rRNA 16S e rRNA 18S, respetivamente.

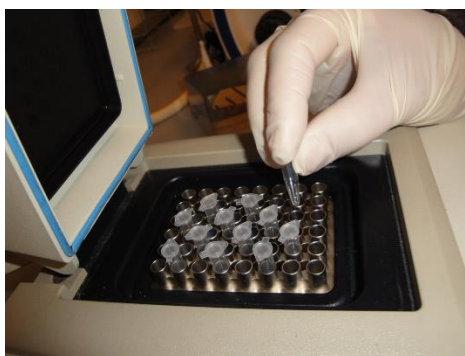


Figura 2.28 - PCR-Amplificação dos fragmentos.

- Eletroforese (verificação da eficiência da amplificação)

A verificação de uma correta amplificação é feita recorrendo a uma eletroforese em agarose, onde se corre em simultâneo um marcador de peso molecular, que permite, por comparação da migração das bandas, determinar o tamanho do fragmento amplificado (Figura 2.29).

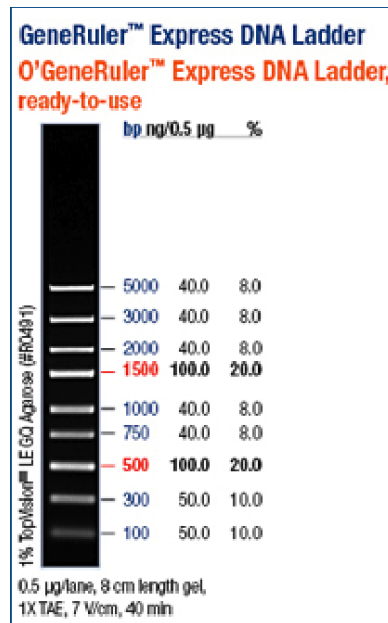


Figura 2.29 - Representação esquemática dos diferentes fragmentos que compõe o marcador de peso molecular e respetivo tamanho.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR são separados em gel de agarose a 1,5% (p/v), usando 90 V durante 40 min. Em cada poço do gel, serão aplicados 5 µL de amostra + 2 µL loading buffer.

Após amplificação correta do fragmento do gene segue-se a purificação do produto do PCR e sua subsequente sequenciação. A sequenciação é feita por uma empresa comercial credenciada, pelo método de Sanger seguida de uma eletroforese capilar, obtendo-se no final um cromatograma, que nos indica a sequência do fragmento amplificado. Esta sequência será posteriormente usada para identificação do microrganismo em estudo.

- Identificação do isolado através da comparação da sequência do gene rRNA 16S ou rRNA18S com as sequências disponíveis em bases de dados

A cada grupo é fornecido o cromatograma obtido por amplificação do gene rRNA 16S ou rRNA 18S para análise da sequência e posterior construção da árvore filogenética.

A análise é efetuada utilizando os programas BioEdit e MEGA de "download" gratuito nos seguintes sites: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> e <http://www.megasoftware.net/mega.php>, respetivamente. Depois de verificar a sequência na totalidade a mesma deve ser copiada (excluindo os nucleótidos iniciais e finais, pois são zonas cuja sequenciação está mais sujeita a erros) e colada no site "Basic Local Alignment Search Tool" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Técnicas independentes de cultivo

As técnicas de Biologia Molecular têm vindo a ser utilizadas não só para conhecer a composição e funcionamento das células, mas também para estudar os microrganismos sem ter que os cultivar, como por exemplo por amplificação do gene rRNA 16S, como referido acima. Outro exemplo é o FISH (Fluorescent in situ Hybridization), que permite identificar organismos específicos numa amostra ambiental, recorrendo a sondas que irão hibridar especificamente com um gene alvo presente apenas no organismo que se quer identificar.

Após identificação do microrganismo e verificação da existência de concordância entre os dados fenotípicos e os obtidos baseando-se na análise do genótipo, é possível desenvolver sondas específicas para identificação in situ do microrganismo estudado.

Utilizando os programas descritos nas aulas teóricas, e com base na sequência de 16S/18S rRNA obtida, os alunos poderão desenhar uma ou mais sondas para o microrganismo em estudo. As sondas devem ter 15 bases de comprimento. A avaliação final das sondas deve ser feita no site do "Ribosomal Database Project" (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Assim os alunos utilizam o método de PNA-FISH para identificação do microrganismo isolado.

Na seção III.3 do anexo é possível a visualização na íntegra do protocolo com o método de PNA-FISH.

2.1.9. Tecnologia Ambiental

O objetivo desta unidade curricular é o desenvolvimento de capacidades de integração de conhecimentos na operação e projeto de processos e tecnologias de tratamento do ar, dos resíduos sólidos e da água e efluentes líquidos.

Nas aulas laboratoriais os alunos vão analisar a tratabilidade de uma água residual sintética utilizando dois reatores diferentes: reator de lamas ativadas (mistura completa) e reator de biodiscos. Neste trabalho o que se pretende é efetuar um tratamento secundário com uma eficiência de remoção, em termos de carência química de oxigénio (CQO) superior a 80%.

Os alunos terão que monitorizar o sistema medindo o caudal de alimentação e de reciclagem de biomassa, a concentração do oxigénio dissolvido nos biorreatores e o pH da alimentação, da entrada do reator, do decantador e da saída.

É pretendido que o sistema seja optimizado para uma eficiência de remoção de CQO máxima. Para tal, devem ser testados vários parâmetros e realizadas algumas análises para determinar os sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e CQO. Os alunos poderão sugerir outro tipo de análise tais como dureza, alcalinidade e turvação.

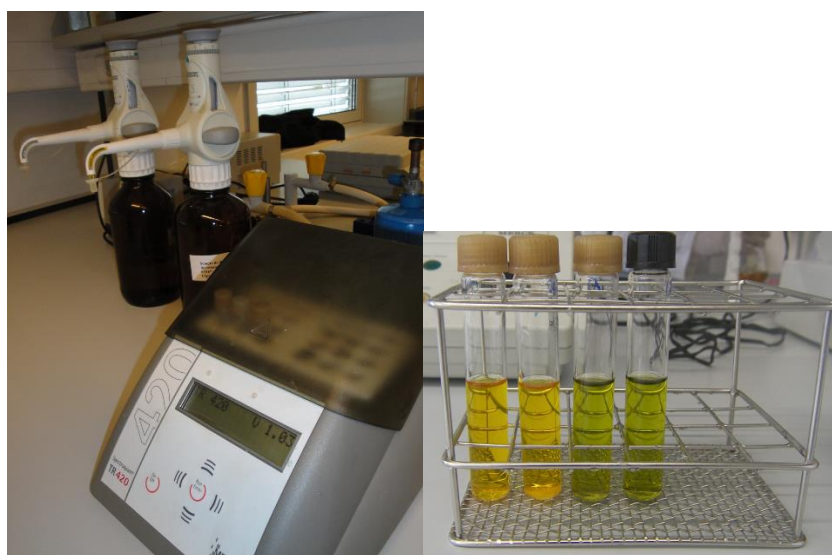


Figura 2.30 - Determinação da CQO - digestor e tubos após digestão.

2.1.10. Tecnologia Alimentar

No decorrer das aulas práticas desta unidade curricular os alunos realizam quatro trabalhos práticos abaixo descritos e um projeto aberto onde fazem a descrição completa de produção de um alimento à escala industrial e elaboram o diagrama de fluxo do processo.

- Caracterização físico-química e reológica de iogurtes

O objetivo deste trabalho é avaliar as características físico-químicas e reológicas de três iogurtes: um iogurte sólido, um iogurte batido e um iogurte líquido.

Os parâmetros analisados são:

- 1) pH
- 2) Viscosidade, recorrendo a um viscosímetro
- 3) Acidez total e acidez em ácido láctico, determinada por titulação com NaOH
- 4) Sólidos totais
- 5) Proteínas, usando o método de Bradford
- 6) Açúcares redutores, usando o método de DNS

É possível a consulta deste protocolo na íntegra uma vez que foi elaborado por mim no âmbito das minhas funções no Departamento de Química.

- Aquecimento por microondas

A energia do microondas é provocada por uma reação electromagnética não ionizante que causa movimento das espécies em solução pela migração de iões e/ou rotação de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna. Este mecanismo não é produzido pela fonte externa de aquecimento, mas sim pela interação entre as microondas e as moléculas da amostra.

A absorção da energia das microondas, assim como o comportamento do aquecimento de materiais alimentares, são determinadas pelas suas propriedades físicas, térmicas e eléctricas. A polaridade da molécula favorece o aquecimento.

O objetivo deste trabalho experimental é a caracterização do processo de aquecimento de diversas soluções líquidas. Os alunos utilizam água, glicerol a 30% e água com 5 g/L de alginato.

- Estudo qualitativo e cinético da secagem de maçãs osmoticamente desidratadas

O processo de secagem permite a redução ou eliminação da quantidade de fase líquida presente num material sólido. Esta diminuição é pretendida a nível industrial por diversos motivos tais como a redução dos custos de transporte, otimização da conservação e armazenamento dos produtos.

A melhoria da conservação dos alimentos associada à secagem é devida ao fato da diminuição do teor de água levar a uma diminuição da atividade microbiológica e enzimática na degradação dos alimentos, bem como a redução da potencial degradação química.

O objetivo deste trabalho consiste na determinação das curvas de secagem para a maçã. Deverão ser elaboradas as curvas da humidade em função do tempo e determinado o valor de humidade crítico. Outro ponto a analisar é a influência dos dois processos de conservação utilizados (NaCl a 1% e ácido ascórbico a 1%) na secagem da maçã.



Figura 2.31 - Comparação do aspecto das maçãs sem tratamento (A) e após tratamentos com ácido ascórbico 1% (B) e NaCl 1% (C) com aspeto das maçãs após aproximadamente 5 horas de secagem.

Em anexo, seção III.5 está apresentada uma descrição detalhada do protocolo.

- Preparação de amostras para controlo microbiológico de alimentos

Os métodos para o isolamento e contagem de microrganismos presentes em alimentos sólidos, pastosos ou líquidos, exigem o tratamento prévio da amostra, de forma a transferir para uma fase líquida os microrganismos presentes no seu interior ou

aderentes à sua superfície. Há pois que garantir uma homogeneização correta da amostra, feita geralmente por processos mecânicos.

Para produtos sólidos a homogeneização vulgarmente é feita por trituração da amostra na presença de um diluidor recorrendo a um triturador elétrico com pás giratórias a alta velocidade. Método este que apresenta desvantagens a nível microbiológico pois o movimento das pás pode fragmentar possíveis estruturas filamentosas dos microrganismos e o calor do movimento das pás também pode alterar a microflora presente na amostra.

Outro método de homogeneização é a colocação da amostra dentro de um saco estéril na presença de um diluidor; a desvantagem é que a homogeneização não é perfeita.

O agente diluidor utilizado também é muito importante pois algumas soluções utilizadas podem ser tóxicas para os microrganismos, particularmente para tempos de contacto excessivos. O diluidor mais utilizado é a água peptonada.

O objetivo deste trabalho é fornecer aos alunos uma estratégia de isolamento de microrganismos presentes numa maçã, introduzindo as técnicas de análise da microflora contaminante da maçã, particularmente o efeito do agente diluidor.

As soluções de diluição utilizadas são: solução de triptona sal, solução de Ringer a $\frac{1}{4}$, solução de salina peptonada e água desionizada.

Os alunos deverão determinar o número de unidades formadoras de colónias para diferentes temperaturas de incubação (4, 26 e 50 °C), em função da solução de homegeneização utilizada.

2.2. Trabalhos para o exterior

No meu percurso na FEUP participei em alguns trabalhos para o exterior, nomeadamente protocolos de colaboração entre a Faculdade de Engenharia e entidades externas, e análises pontuais de amostras de água (bacteriológicas e físico-químicas) adjudicadas à FEUP. O meu contributo foi essencialmente a nível da realização de análises laboratoriais que permitiram definir a qualidade das águas analisadas. Neste contexto são elaborados boletins de análise apresentando-se na seção IV do anexo exemplos dos mesmos.

De seguida são elencados os projetos nos quais participei:

- Avaliação da qualidade da água do Rio Ferreira

Este projeto decorreu em 2005 e foram efetuadas análises em 3 pontos de amostragem. Participei na realização das seguintes análises físico-químicas e microbiológicas: SST, SSV, azoto total (N total), NTK, N amoniacal, nitritos, nitratos, fósforo total, CQO, CBO₅, coliformes totais, coliformes fecais e enterococos fecais.

- Avaliação da qualidade da água do Rio Tinto

Participei neste projeto entre setembro de 2004 e março de 2005.

O objetivo do trabalho foi a avaliação da qualidade da água do ponto de vista físico-químico e bacteriológico, com determinação de parâmetros gerais e parâmetros mais específicos, tendo em conta a preservação e desenvolvimento da vida aquática. Foram realizadas 4 campanhas e consideradas 11 estações de amostragem, distribuídas entre um local imediatamente a montante da ETAR de Rio Tinto e a foz do rio.

De seguida apresentam-se os resultados das determinações microbiológicas que realizei:

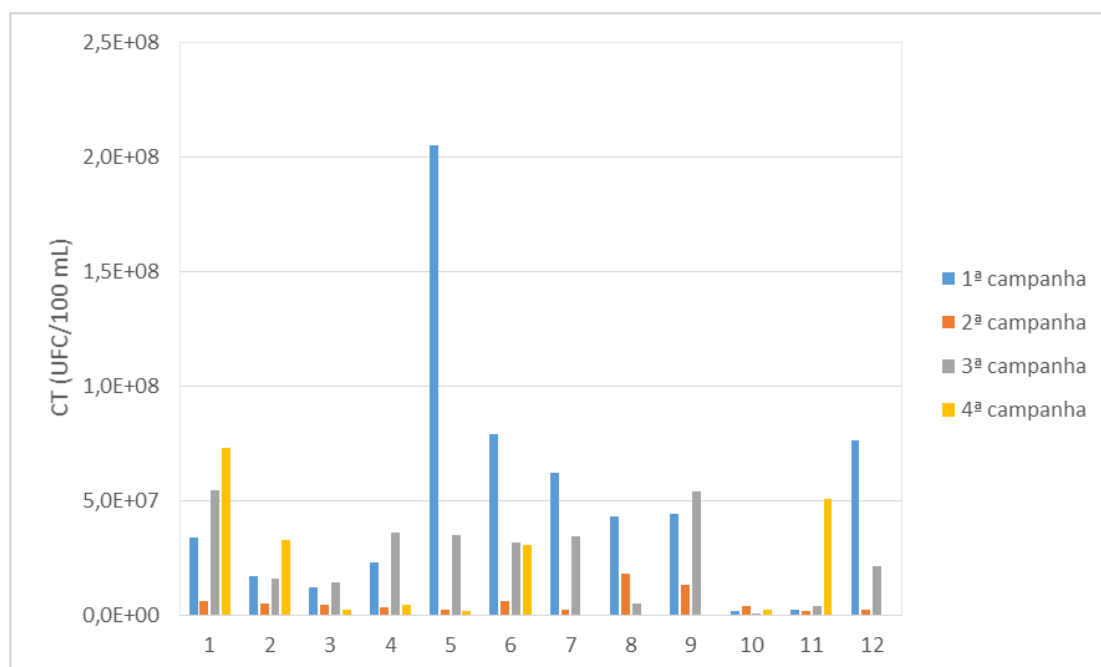


Figura 2.32 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.

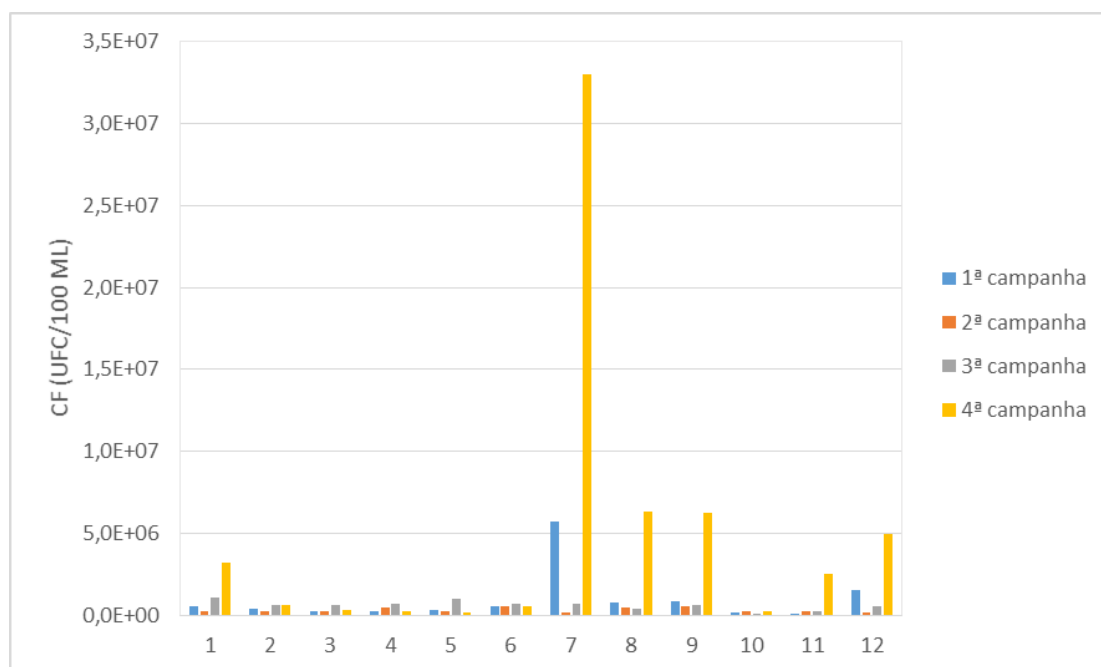


Figura 2.33 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.

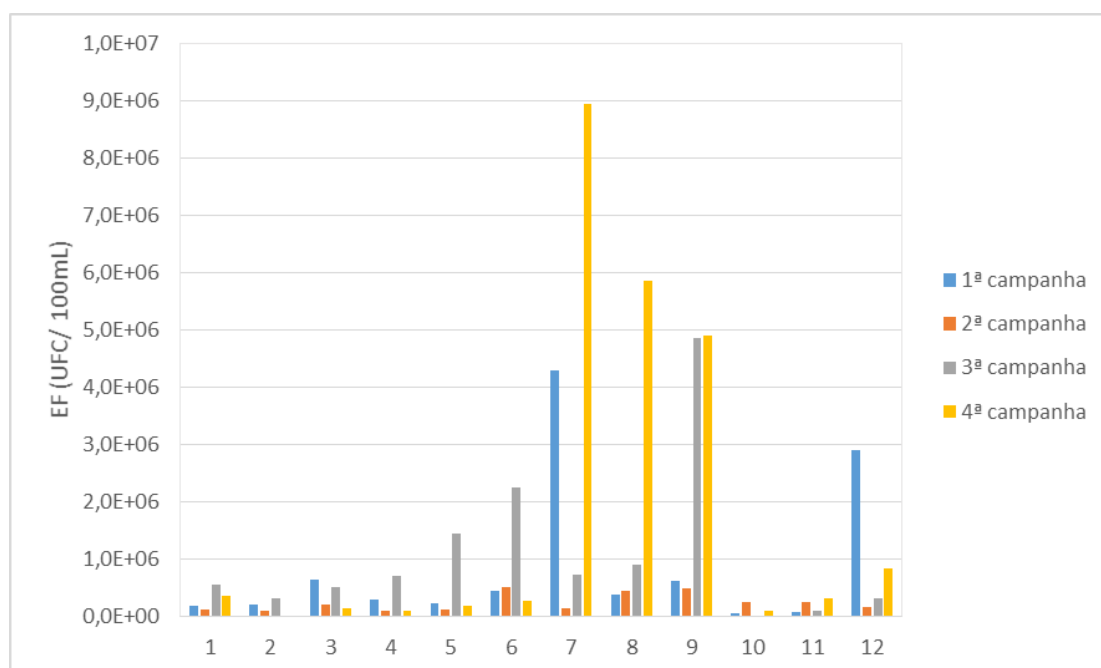


Figura 2.34 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Tinto.

- Avaliação da qualidade da água do Rio Âncora

Este projeto decorreu entre julho de 2008 e janeiro de 2009 e foram realizadas 3 campanhas com 4 estações de amostragem cada. Realizei a análise dos coliformes totais, fecais e enterococos fecais.

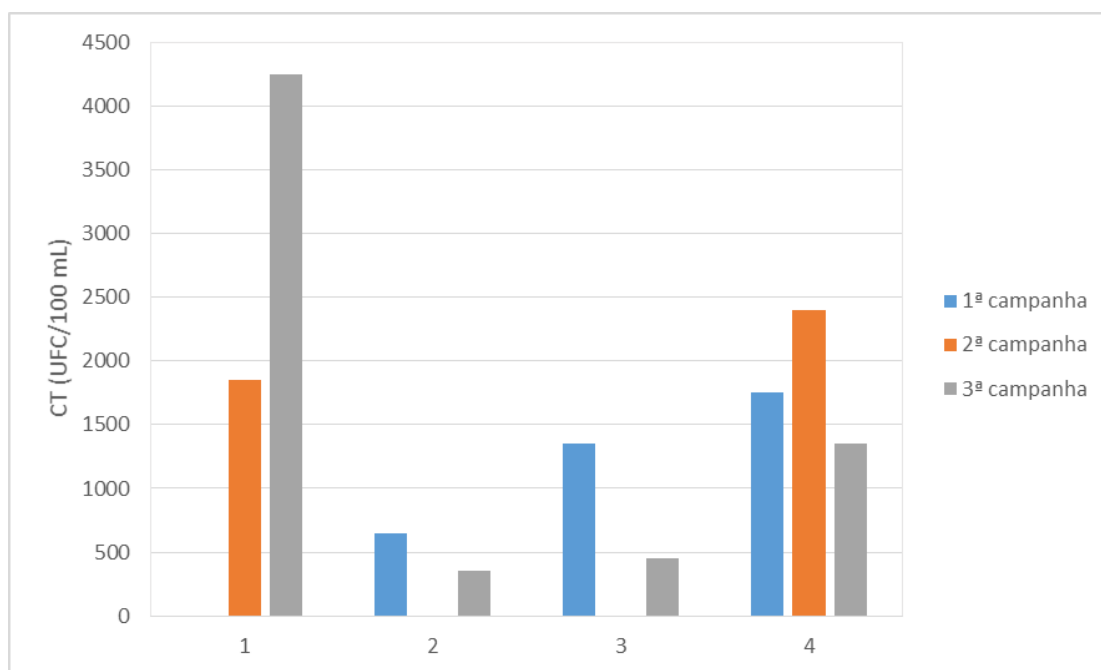


Figura 2.35 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.

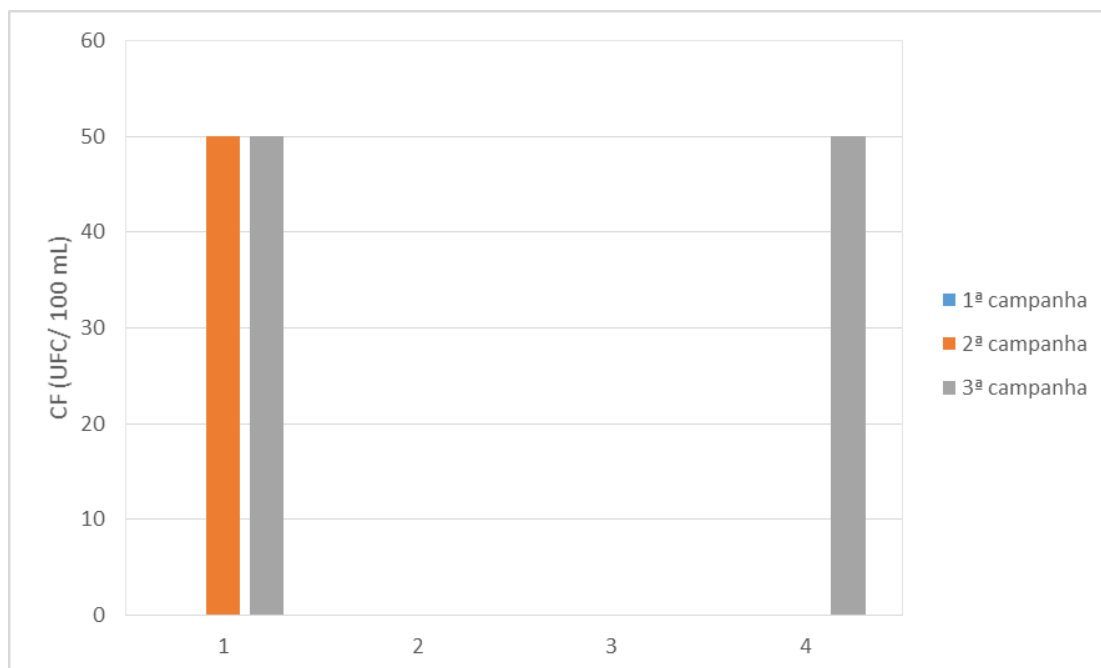


Figura 2.36 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.

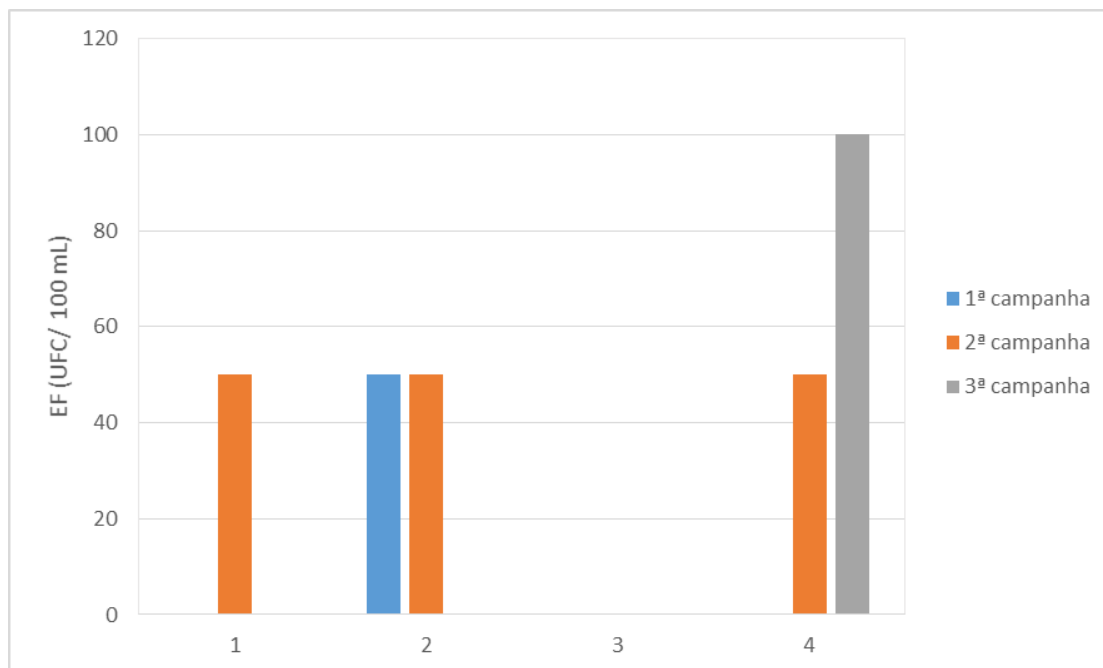


Figura 2.37 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Âncora.

- Plano de Monitorização Ambiental do Porto de Leixões - Fase anterior ao início da construção. Qualidade da água e dos sedimentos

Foi objetivo deste trabalho avaliar a qualidade da água e dos sedimentos no Porto de Leixões, antes do início das operações de dragagem, e num ponto de controlo exterior. Para a recolha de amostras de água foram selecionados os locais propostos no Estudo de Impacte Ambiental, acrescidos de um ponto no posto C, de outro à entrada do canal de acesso e de um outro fora da área de influência do Porto de Leixões. Relativamente à caracterização de sedimentos, foram escolhidos 36 locais de amostragem, incluindo o ponto de controlo estabelecido para avaliar a qualidade da água e o local destinado à imersão do material dragado.

As campanhas para análise da qualidade de águas foram realizadas entre agosto de 2005 e abril de 2008 perfazendo um total de 35 campanhas. Quanto à caracterização dos sedimentos resumiu-se a um total de 8 campanhas entre agosto de 2005 e julho de 2007.

Participei na realização análises físico-químicas até 2007 e os parâmetros determinados para análise da qualidade de águas foram: nitratos, substâncias tensioativas, COT, chumbo (Pb) total, cobre (Cu) total, zinco (Zn) total, crómio (Cr) total, cádmio (Cd) total, níquel (Ni) total e mercúrio (Hg) total. Para caracterização física e química dos

sedimentos foram determinados a densidade, teor de Sólidos, Cr, Pb, Ni, Zn, Cd, Cu, Hg, arsénio (As) e toxicidade.

Nas figuras seguintes podem ser visualizadas as estações de amostragem para a caracterização das águas e sedimentos.

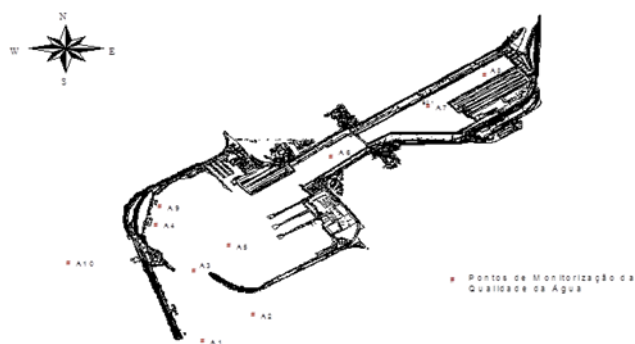


Figura 2.38 - Estações de amostragem para a caracterização da água.

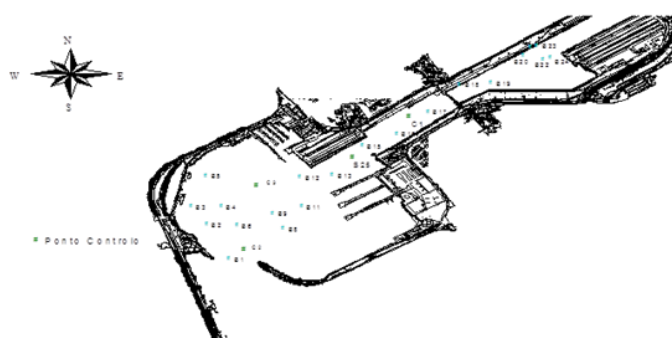


Figura 2.39 - Estações de amostragem para a caracterização de sedimentos.

- Valorização dos recursos naturais da bacia hidrográfica do Miño-Minho, Projeto POCTEP/0234_NATURA_MINO_MINHO_1_E, financiado pelo Programa de Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal, 2007-2013

As atividades desenvolvidas incluíram a recolha de informação diversa e relevante acerca da Bacia Hidrográfica do Minho, a realização de sete campanhas de monitorização da qualidade da água superficial e de três campanhas de monitorização da qualidade dos sedimentos na Bacia Hidrográfica do Minho, a modelação matemática da qualidade da água superficial em diferentes condições e ainda a utilização de um modelo para a previsão de cenários.

As campanhas de monitorização da qualidade das águas superficiais foram realizadas entre maio de 2009 e outubro de 2010 e realizei a determinação dos coliformes totais, coliformes fecais, Enterococos fecais. A área de estudo consistiu no troço internacional do Rio Minho e seus principais afluentes como se pode ver na figura abaixo.

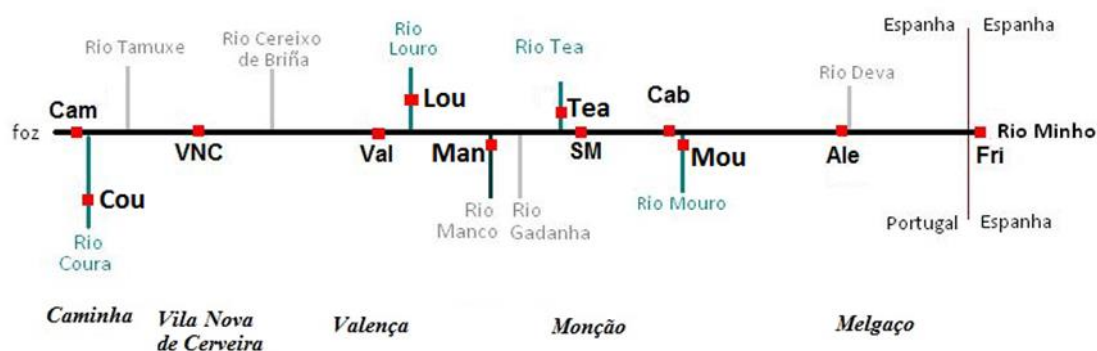


Figura 2.40 - Localização esquemática dos pontos de monitorização.

É possível, analisando as figuras que se seguem, visualizar os resultados obtidos nas várias campanhas realizadas.

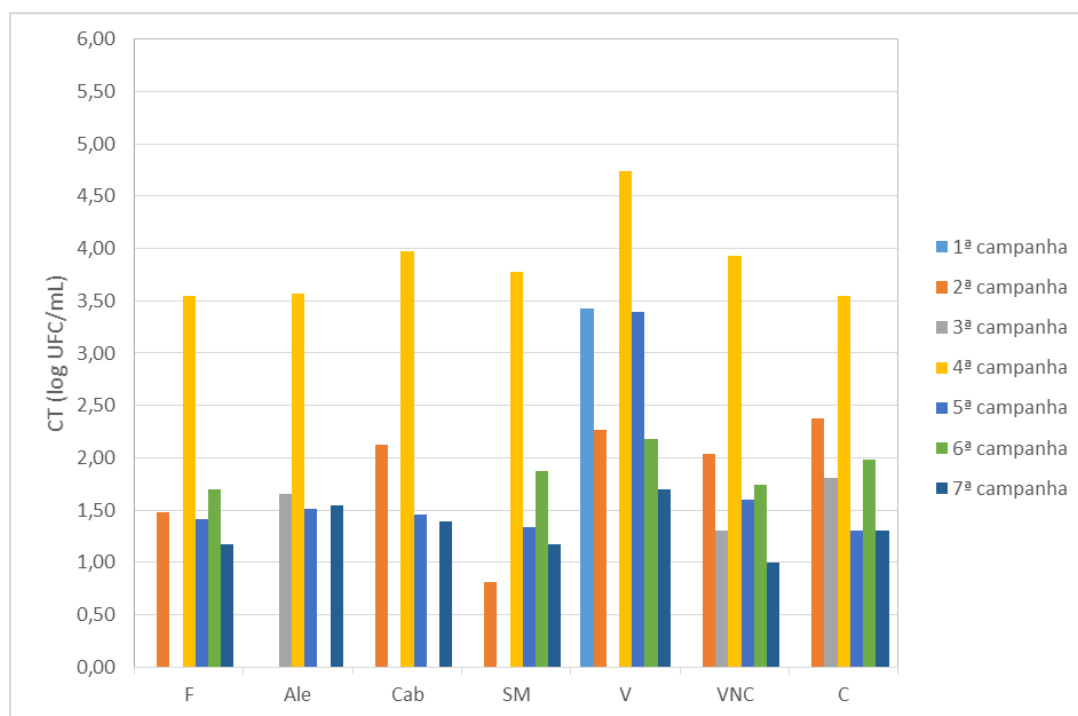


Figura 2.41 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.

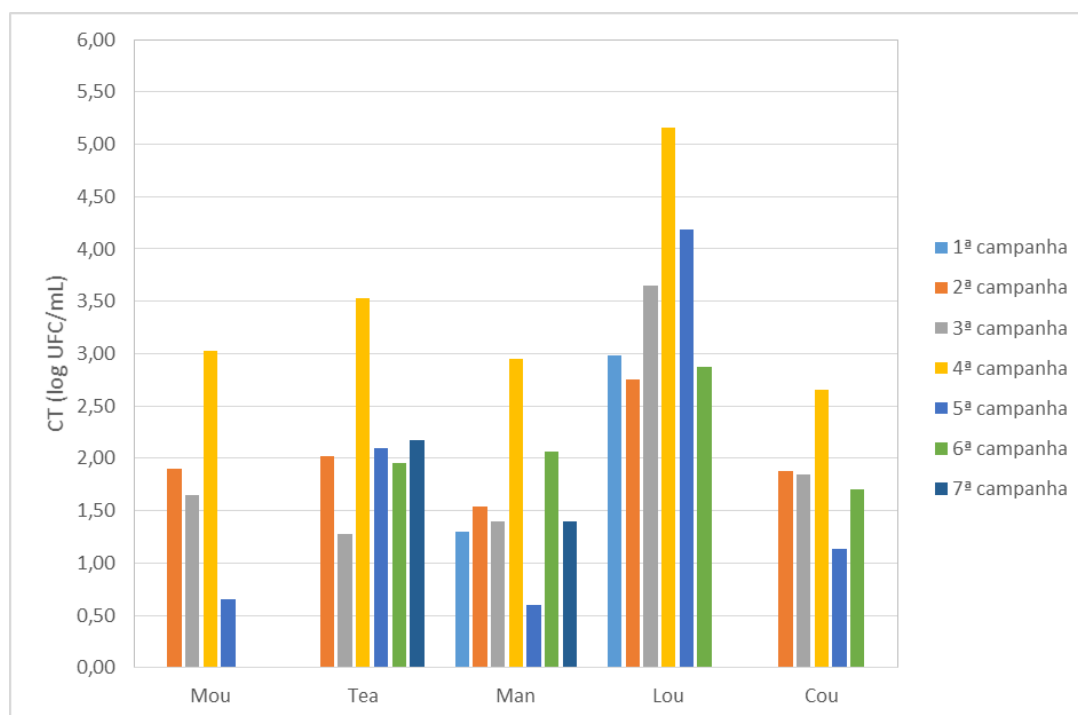


Figura 2.42 - Evolução da concentração de coliformes totais ao longo do período de monitorização, nos afluentes do Rio Minho.

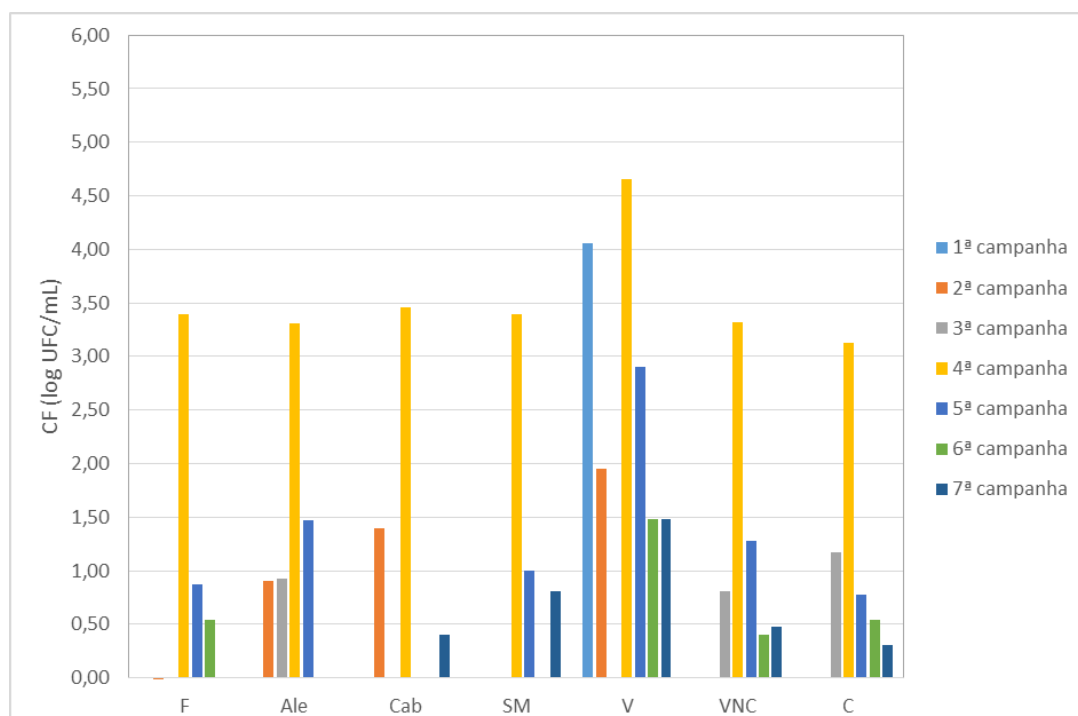


Figura 2.43 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.

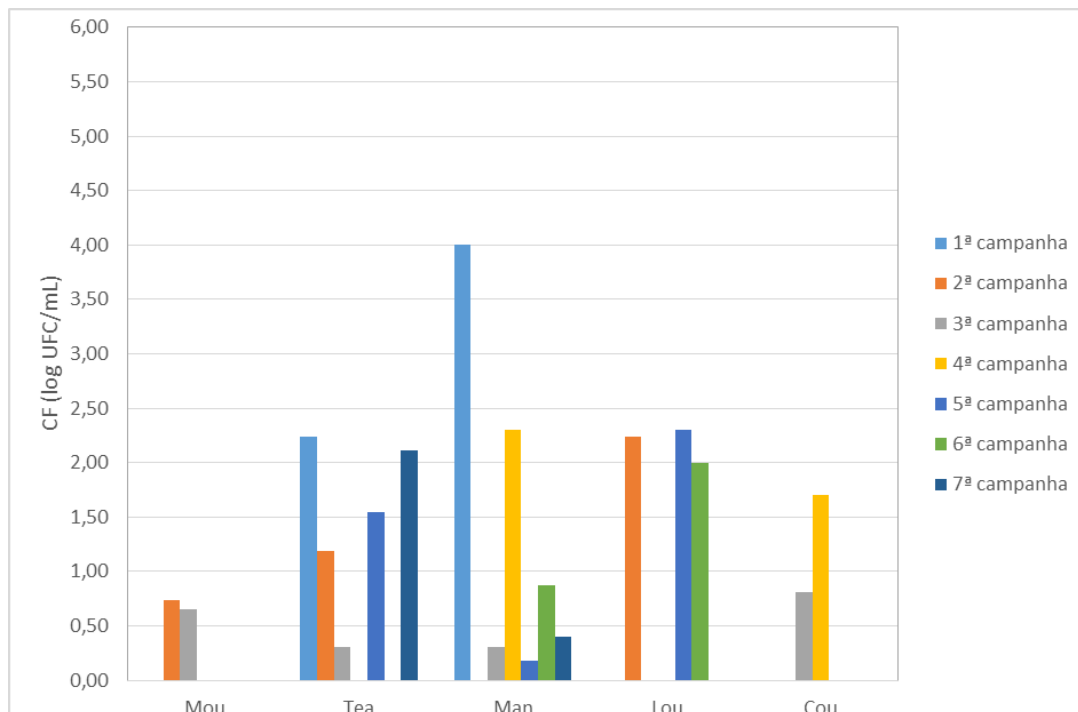


Figura 2.44 - Evolução da concentração de coliformes fecais ao longo do período de monitorização, nos afluentes do Rio Minho.

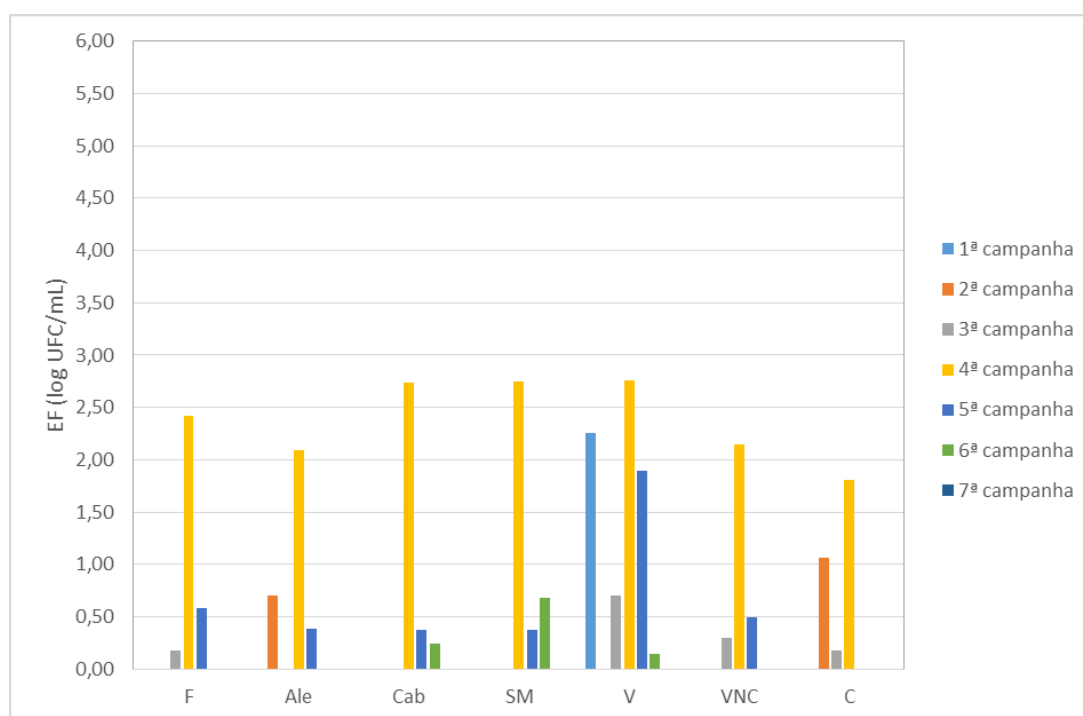


Figura 2.45 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.

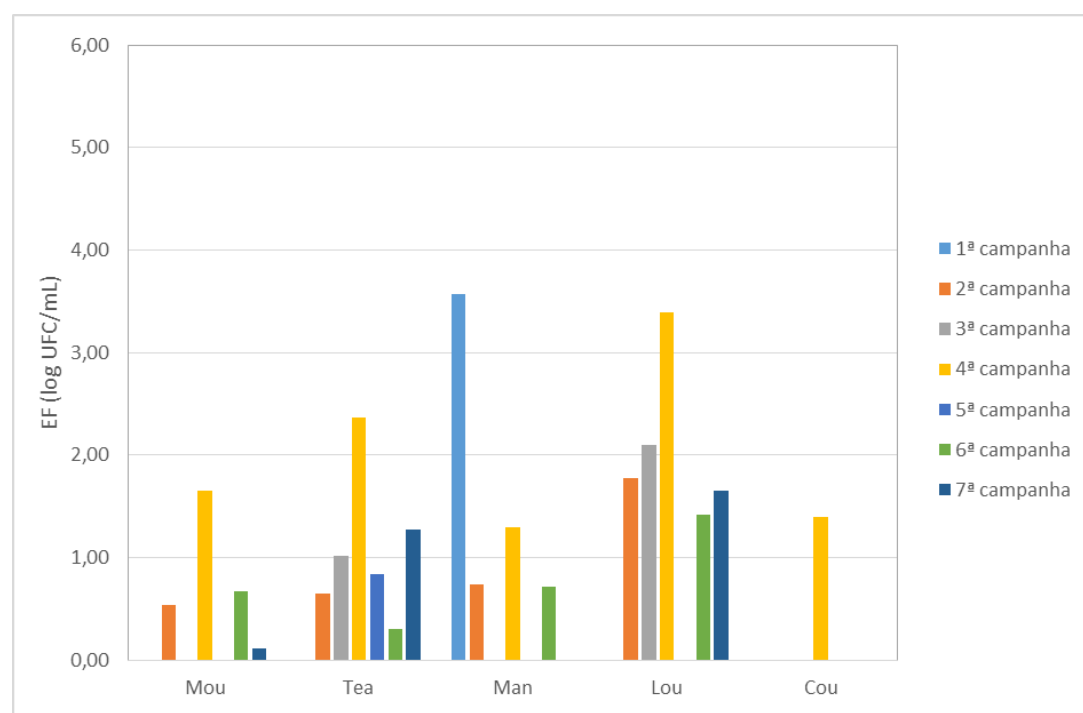


Figura 2.46 - Evolução da concentração de enterococos fecais ao longo do período de monitorização, no Rio Minho.

- Acompanhamento e Monitorização Ambiental da empreitada de Construção das obras marítimas do Terminal de Cruzeiros de Leixões - Fase de Pré-construção

Foi objetivo deste trabalho avaliar a qualidade da água e dos sedimentos no Porto de Leixões, antes do início das operações de dragagem para a construção do Terminal de Cruzeiros. Para a recolha de amostras de água foram seleccionados os locais propostos no Estudo de Impacte Ambiental, acrescidos de um ponto no local de imersão do material dragado. Relativamente à caracterização de sedimentos, foram escolhidos 10 locais de amostragem propostos no Estudo de Impacte Ambiental.

As amostras de água foram recolhidas em 7 locais propostos no EIA (TCA01 a TCA7) a cerca de 50 cm abaixo da superfície livre da água, acrescido de um ponto fora da área de influência do Porto de Leixões (imersão dos sedimentos) a três profundidades (superfície – TCA08, zona eufótica – TCA09 e fundo – TCA10).

A figura abaixo permite visualizar os pontos de amostragem.

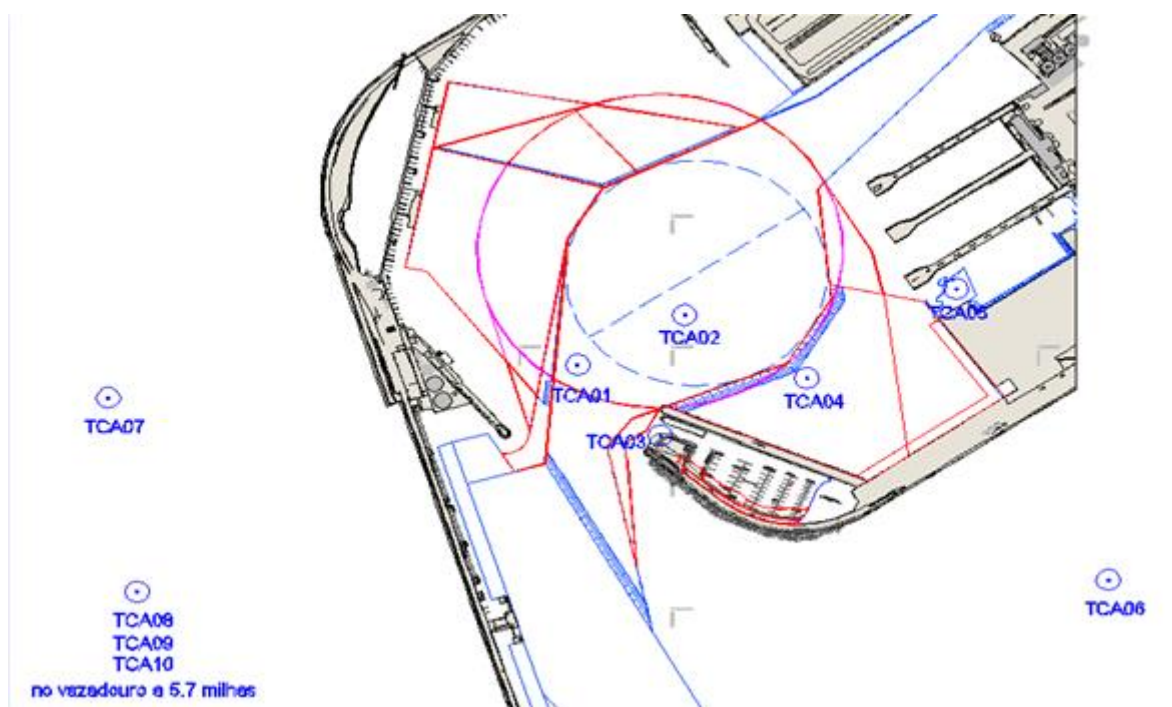


Figura 2.47 - Estações de amostragem para a caracterização da água.

Foram realizadas 9 campanhas de amostragem decorridas entre agosto de 2009 e abril de 2011.

Analisando as figuras abaixo pode ver-se a evolução dos parâmetros microbiológicos por mim realizados: coliformes totais, *E. coli* e enterococos fecais.

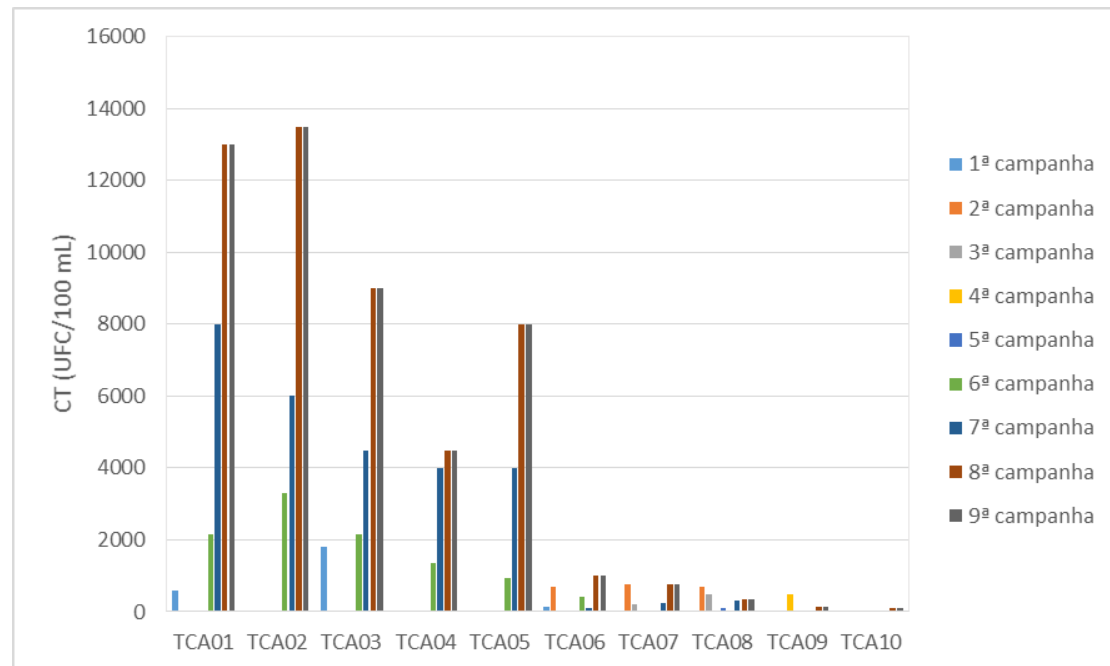


Figura 2.48 - Evolução dos coliformes totais ao longo das várias campanhas.

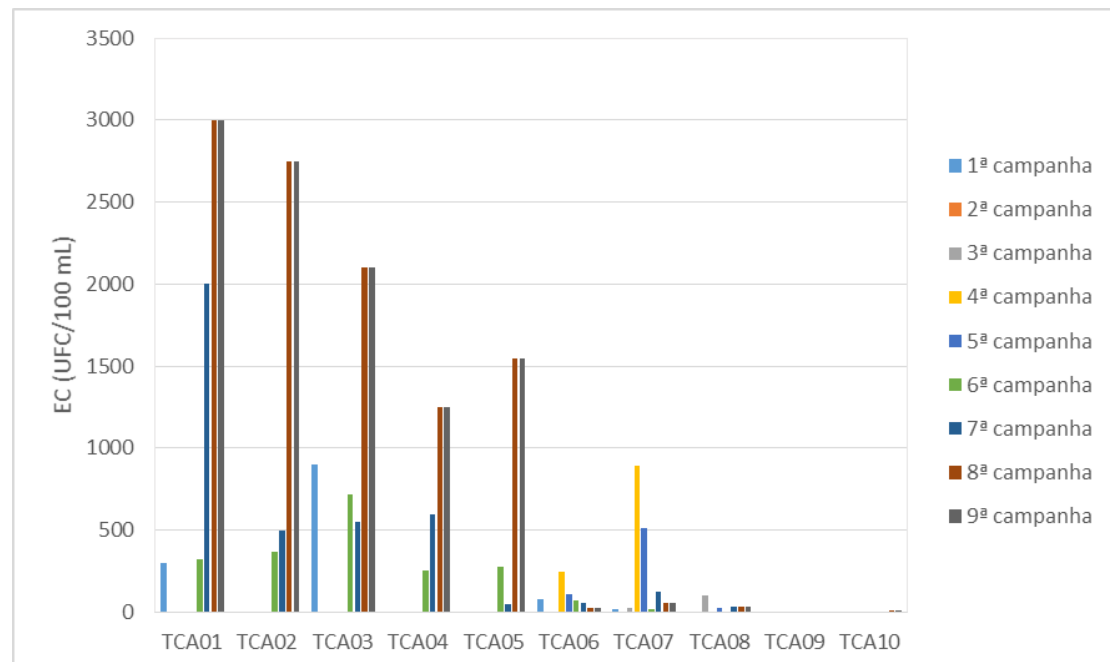


Figura 2.49 - Evolução da *E. coli* ao longo das várias campanhas.

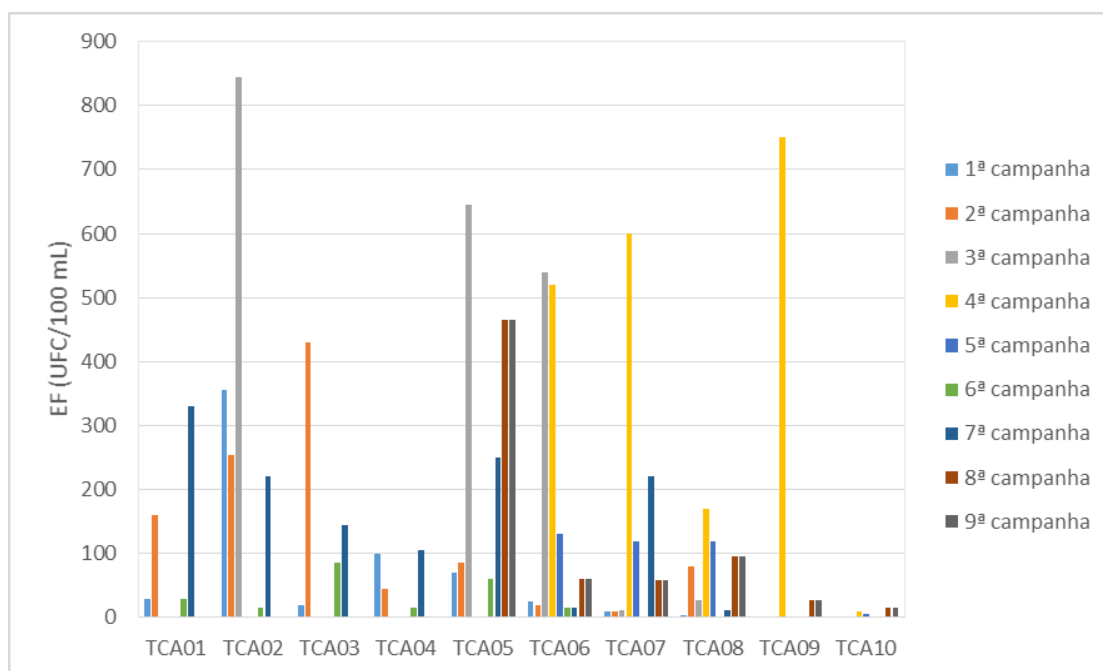


Figura 2.50 - Evolução dos enterococos fecais ao longo das várias campanhas.

- Análise das águas de consumo do Departamento de Engenharia Química

Em novembro de 2011 procedi à análise das águas de consumo de DEQ na sequência de vários alertas sobre o mau sabor da água em questão.

Foram recolhidas duas amostras: a água do garrafão e a água do mesmo garrafão depois de passar no sistema de filtração.

Os parâmetros analisados foram: Heterotróficos totais a 37 °C e a 22 °C, fungos, leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Escherichia coli*.

Verifiquei que a carga microbiana é muito elevada e pelos resultados da contagem dos heterotróficos totais é possível concluir que existem pelo menos 4 microrganismos diferentes; A presença da *E. coli* não foi detetada pelo que o resultado foi negativo.

O meio presuntivo utilizado para detetar *P. aeruginosa* apresentou crescimento microbiano mas a pigmentação das colónias não indica a presença da bactéria não sendo por isso efetuado o teste confirmativo.

A presença de leveduras também não foi detetada. Numa das diluições que utilizei na análise confirmou-se a presença de fungos e de uma “pasta” de microrganismos à qual fiz um esfregaço e verifiquei serem bactérias.

Os resultados não foram muito conclusivos pois para alguns parâmetros não existem valores de referência e/ou valores limite na legislação.

Sugeri a realização de uma análise a uma água conhecida no mercado e compará-la com a amostra. Esta, no entanto, não deve ser uma análise pontual para poder estudar ao longo do tempo a qualidade da água e tirar conclusões. Também deverão ser efetuadas mais diluições.

2.3. Apoio a dissertações/teses

Desde que integrei no DEQ foram várias as teses nas quais pude prestar a minha contribuição. Em algumas, as quais elenco de seguida, a minha participação foi maior uma vez que realizei a parte das análises microbiológicas, outras apenas dei alguns conselhos profissionais tanto a nível prático como teórico.

Resumidamente apresento as teses para as quais realizei algum trabalho experimental:

- Co-compostagem de resíduos Avícolas e de Resíduos Florestais

Este trabalho constituiu a parte experimental de uma tese de mestrado realizada pela aluna Maria Elisabete Ferreira Silva realizada em 2003.

O objetivo do trabalho foi aprofundar o conhecimento existente acerca da possibilidade de co-compostagem de resíduos avícolas e florestais. Foram estudados, à escala piloto, mecanismos associados à bio-oxidação de resíduos avícolas com dois tipos de resíduos (o serrim e a palha), no sentido de desenvolver as metodologias necessárias para controlar e otimizar o processo e a qualidade do composto final.

A minha contribuição nesta tese foi dada a nível das análises microbiológicas. Na avaliação da qualidade do composto em termos microbiológicos foram estudados os coliformes totais, coliformes fecais e *Enterococcus faecalis* e o microrganismo patogénico *Salmonella* spp.

- Transformações Biogeoquímicas na Bacia Hidrográfica do Rio Lis

Este trabalho constituiu a tese de doutoramento da aluna Judite dos Santos Vieira.

Pretendeu-se com este trabalho avaliar a situação atual dos recursos hídricos da bacia hidrográfica do Lis, no período correspondente aos anos hidrológicos de 2003/04 a 2006/07, em termos de qualidade das águas, qualidade dos sedimentos e a capacidade de autodepuração relativamente à remoção de azoto e de matéria orgânica.

A monitorização da qualidade das águas na bacia foi efectuada em 16 locais de amostragem, através de 6 campanhas, tendo em consideração os afluentes principais e a localização das principais fontes poluidoras. A qualidade das águas foi avaliada em termos de matéria orgânica, nutrientes, contaminação fecal, clorofila e contaminação por metais. Foram estimadas as principais cargas poluentes a partir do levantamento das fontes poluidoras e da caracterização de um efluente suinícola.

Embora pontualmente tenha prestado algum auxílio ao nível das análises físico-químicas realizadas, novamente o meu contributo foi a realização das análises microbiológicas, nomeadamente os coliformes totais, coliformes fecais e Enterococos fecais.

- Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais - Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça

A avaliação ecotoxicológica da qualidade de águas superficiais recorrendo aos ensaios de toxicidade em laboratório deve ser encarado como um diagnóstico complementar em águas que evidenciam possível contaminação. Daí que o rio Leça, considerado um dos mais poluídos da Europa, tenha sido escolhido como alvo de estudo constituindo a tese de mestrado da aluna Ana Isabel de Emílio Gomes.

Foram realizadas 5 campanhas de amostragem e análise de água do rio Leça, em 7 pontos de amostragem seleccionados. Foi também recolhida uma amostra de efluente final da ETAR de Parada. As campanhas foram realizadas em 19 de Fevereiro 2006, 7 de Maio de 2006, 21 de Junho de 2006, 15 de Agosto de 2006 e 24 de Setembro de 2006 e mais uma vez participei na análise dos coliformes totais, coliformes fecais e enterococos fecais.

- Tratamento de Efluentes Têxteis por Processos Combinados de Oxidação Química e Biológica

Este trabalho constitui a tese para obtenção do grau de mestre da aluna Carmen Susana de Deus Rodrigues realizada em 2007.

Durante a execução da parte experimental contribui dando uma pequena ajuda na realização dos testes de respirometria.

- Otimização Ambiental do Uso de Água em Edifícios

No âmbito da tese de doutoramento da aluna Cristina Maria Monteiro dos Santos, realizei a análise dos coliformes totais e coliformes fecais de 2 tipos de amostras de águas: uma água bruta e uma água depois de tratada. Ambas as amostras de água foram recolhidas nas instalações sanitárias da FEUP. Foram realizadas 4 campanhas entre dezembro de 2008 e fevereiro de 2010.

- Caracterização das fontes de poluição na orla costeira do Concelho de Matosinhos e respetivo impacte sobre a qualidade das águas balneares

Este projeto surgiu de um Protocolo de Colaboração entre a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e a Indaqua Matosinhos – Gestão de Águas de Matosinhos, S.A. , decorrido de janeiro a dezembro de 2009 o qual constituiu tese de mestrado da aluna Celeste Andreia de Sá Reis.

Constituiu objetivo principal deste projeto avaliar o impacte decorrente da poluição dos recursos hídricos superficiais na qualidade da água para fins balneares, no concelho de Matosinhos. Complementarmente foram caracterizadas fontes de poluição difusa e de origem industrial. As amostras de água foram recolhidas junto da foz das Ribeiras do concelho de Matosinhos e, no caso do Rio Onda e do Rio Leça, foram ainda considerados pontos de amostragem adicionais, no limite do concelho. Foi ainda colhida uma amostra num coletor de águas pluviais (CRO), na margem direita do Rio Onda, junto à foz. Total: 13 pontos de amostragem.

As campanhas foram realizadas em janeiro, março, maio, julho, agosto, setembro e novembro de 2009.

As análises bacteriológicas foram realizadas por mim, tendo sido analisados os coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e Enterococos fecais.

- Textile Dyeing Wastewater Treatment by Single and Integrated Processes of Coagulation, Chemical Oxidation and Biological Degradation

Na tese de doutoramento da aluna Carmen Susana de Deus Rodrigues dei uma pequena ajuda na realização dos testes de coagulação/floculação, oxidação avançada com reagente de Fenton e testes respirométricos.

2.4. Orientação de estágios

No DEQ são vários os pedidos de estágios profissionais para alunos por parte de escolas que lecionam cursos técnico-profissionais. Neste contexto o laboratório ao qual estou alocada é um dos destinos procurados pois permite a estes alunos alargarem os conhecimentos adquiridos na sua formação à área do Ambiente e Bioengenharia. Temos recebido alunos do externato Santa Clara e da Escola Secundária Fontes Pereira de Melo interessados nesta área. Sempre que possível os alunos são integrados com os alunos de mestrado integrado, assintindo com eles às aulas laboratoriais e participam simultaneamente na preparação das mesmas, para adquirirem a noção de que o material, soluções, meios e tudo o resto necessário para que a aula decorra normalmente, necessita de ser pensado e preparado com a devida antecedência, principalmente quando se trabalha com microrganismos. À parte disso é-lhes solicitado pequenos trabalhos práticos sendo-lhes facilitado protocolos ou pequenos guiões de trabalho para que eles os consigam realizar. No final estes alunos são avaliados por nós na parte prática e na parte escrita pela respetiva escola, uma vez que eles apresentam um relatório final de estágio (previamente revisto por nós).

2.5. Apoio a iniciativas FEUP/DEQ

Existem várias iniciativas promovidas pela FEUP e pelo próprio DEQ no sentido de divulgar os cursos existentes na instituição.

Passo a enumerá-las:

- Mostra da UP

Esta é uma iniciativa realizada a nível da Universidade do Porto em que todas as Faculdades participam levando experiências apelativas para atrair os futuros alunos.

O meu laboratório contribui para esta iniciativa promovendo a divulgação dos cursos do MIEQ e MIB.

Normalmente na mostra da UP (realizada no edifício da alfândega do Porto) são os alunos do mestrado integrado que fazem a demonstração das experiências para proporcionar aos visitantes obterem opiniões na 1ª pessoa e esclarecer todas as dúvidas que possam ter sobre os vários cursos da Universidade do Porto.

Para o MIB são mostradas as seguintes experiências:

- 1) Demonstração do processo de fermentação microbiana e da sua aplicação (fermentação do vinho e cerveja)
- 2) Demonstração da diversidade microbiana: como diferenciar microrganismos numa mistura
- 3) Demonstração da modelação computacional de proteínas e da sua interação com fármacos: estabilização da transtirretina por iododiflunisal
- 4) Imobilização de enzimas em alginato
- 5) Microalgas: microrganismos fotossintéticos
- 6) Estudo da espacialidade sonora do sistema auditivo humano

Para o MIEQ:

- 1) Demonstração do processo de fermentação microbiana e da sua aplicação (iogurte)

- Semana Profissão Engenheiro

A semana profissão engenheiro é realizada a nível da FEUP e permite aos alunos do ensino secundário conhecerem os diferentes cursos que existem na instituição.

No laboratório são efetuadas algumas sessões onde é apresentado o MIB. De uma forma resumida é-lhes explicada a produção de um antibiótico (penicilina) e a imobilização de enzimas em alginato.

As apresentações são realizadas por alunos do 1º ano do programa doutoral e/ou por mim (ou outra Técnica do laboratório).

- Universidade Júnior

Durante o mês de Julho a Universidade do Porto abre porta as jovens do 5º ao 11º ano de escolaridade para ocuparem os tempos livres de uma forma construtiva.

No DEQ, nomeadamente no laboratório de Tecnologias recebemos alunos do 9º ao 11º ano por um período de 2 semanas e a atividade chama-se “À Descoberta das Potencialidades da Biotecnologia e da Engenharia Biológica”. Estes jovens tem a possibilidade de serem “engenheiros” por uma semana (cada). Durante esta semana e na presença de um monitor os alunos fazem algumas experiências as quais realizamos nas nossas aulas laboratoriais. O monitor normalmente é um aluno do 4º ano, experiente, e todas as experiências são preparadas por nós (Técnicas).

As experiências realizadas são:

- 1) Tratamento físico-químico e biológico de águas residuais
- 2) Produção de iogurte
- 3) Determinação das constantes cinéticas da invertase em células livres e imobilizadas em alginato
- 4) Produção e purificação de penicilina G
- 5) Avaliação da eficácia de antibióticos
- 6) Produção de biocombustível
- 7) Cultivo dos microrganismos que nos rodeiam

- Escola de Ciências da Vida e da Saúde

Na primeira semana de setembro no laboratório Biologia Celular e Molecular recebemos alunos do 11º ano que se tenham inscrito na atividade.

Durante este período os alunos estão no laboratório onde lhes é fornecido um pequeno guião de trabalho com técnicas básicas na área da microbiologia e biologia molecular.

3. Conclusões

O percurso académico e profissional realizado permitiram a aquisição de conhecimentos na área da Engenharia do Ambiente, e um vasto conjunto de aptidões nomeadamente a capacidade de resolução de problemas e de trabalhar em equipa.

A constante vontade em adquirir novos conhecimentos e o interesse crescente no Ambiente incentivaram à minha frequência na pós graduação em Engenharia do Ambiente na área de Tratamento de Águas e Águas Residuais e agora à realização deste trabalho.

4. Perspetivas Futuras

Tendo em conta que a minha atividade ainda está longe de estar concluída, a ambição num futuro próximo é continuar a aprender e a partilhar experiências e conhecimentos.

Continuar a progredir e inovar atividades na área da bioengenharia e ambiente será concerteza um lema a seguir.

Num futuro próximo pretendo escrever dois artigos pedagógicos um sobre estudo da biodegradabilidade de uma água residual e o efeito da presença de um pesticida, o molinato, e outro sobre a produção de um antibiótico e avaliação da sua atividade microbiana.

Tenho todo o interesse em estudar e propor novos trabalhos laboratoriais para tornar o trabalho mais desafiante para mim.

5. Referências

Os professores com quem trabalhei no DEQ:

Professor Doutor Rui Boaventura

bventura@fe.up.pt

Telefone – 220413667

Professora Doutora Olga Nunes

opnunes@fe.up.pt

Telefone – 220413655

Professor Doutor Filipe Mergulhão

filipem@fe.up.pt

Telefone – 220413611

Professor Doutor Manuel Simões

mvs@fe.up.pt

Telefone - 225081654

Anexo

I. Manuais de Instrução de Equipamentos

I.1. Instruções de utilização da centrífuga Eppendorf 5424

ANTES DE CENTRIFUGAR: Cuidados com a preparação das amostras

1. Verifique se os tubos de centrífuga que possui são compatíveis com a sua amostra e com o equipamento. A centrífuga Eppendorf 5424 vem equipada com o rotor FA-45-24-11 que permite a centrifugação de tubos de 0,5 a 2 ml.
2. Verifique se os tubos podem ser utilizados à sua velocidade de trabalho. A velocidade máxima de centrifugação permitida pelo rotor FA-45-24-11 é 14000 rpm.
3. Nunca encha totalmente os tubos. Se a amostra couber apenas num tubo, encha outro tubo com água para equilibrar.
4. Equilibre os tubos 2 a 2. Estes tubos têm que ter o mesmo volume e aproximadamente a mesma densidade.
5. Os tubos têm que ser introduzidos no rotor em cavidades diametralmente opostas.

Instruções de funcionamento da centrífuga:

SE É A PRIMEIRA VEZ QUE VAI UTILIZAR A CENTRÍFUGA PEÇA AJUDA A UM DOS INVESTIGADORES OU RESPONSÁVEIS DO LABORATÓRIO. NÃO UTILIZE O EQUIPAMENTO SOZINHO!

1. Ligue a centrífuga no botão localizado na parte de trás do equipamento. As condições da última centrifugação efectuada são apresentadas.
2. Carregue no botão OPEN para abrir a porta da centrífuga. Ao mesmo tempo que carrega no botão apoie a abertura da porta da centrífuga.
3. Abra a tampa do rotor, rodando para o lado esquerdo a rosca.
4. Introduza os tubos com a sua amostra já devidamente equilibrados 2 a 2 em cavidades diametralmente opostas do rotor (ver acima Cuidados com a preparação das amostras).
5. Feche o rotor com a tampa, rodando para o lado direito a rosca.
6. Feche a tampa da centrífuga. A luz do botão OPEN fica azul.
7. Selecione as condições de operação pretendidas:

Nota: A centrífuga Eppendorf 5424 apenas permite realizar centrifugações à temperatura ambiente!

7.1. **Tempo:** Selecione o tempo de centrifugação pretendido (até 09h59min) rodando a rosca TIME.


7.2. **Velocidade de centrifugação:** Selecione as unidades de velocidade pretendidas (rpm ou rcf) pressionando o botão RPM/RCF. Em seguida, selecione a velocidade de centrifugação desejada rodando a rosca SPEED.

Nota: A velocidade máxima de centrifugação do rotor fornecido com a centrífuga 5424 (código FA-45-24-11) é 14000 rpm!

Por definição, as velocidades de aceleração e desaceleração estão reguladas no nível máximo. No entanto, é possível selecionar um modo de aceleração e desaceleração SOFT:


7.2.1. Carregue no botão MENU/ENTER.

7.2.2. Em seguida, carregue no botão , selecione o item SOFT e carregue novamente em MENU/ENTER para confirmar.

7.2.3. Agora está no segundo nível do menu. Carregue no botão  e selecione ON para velocidades de aceleração e desaceleração SOFT ou OFF para aceleração e desaceleração normais.

7.2.4. Carregue no botão MENU/ENTER para confirmar a sua seleção.

7.2.5. Aparece BACK no visor. Carregue novamente no botão MENU/ENTER para sair do menu.

7.2.6. Se tiver selecionado o nível SOFT de aceleração e desaceleração, aparece o símbolo  no visor.

8. Verifique todas as condições.

9. Inicie a centrifugação carregando no botão START/STOP. O símbolo ■ aparece intermitente.

10. Não abandone a centrífuga enquanto não se atingir a velocidade máxima que selecionou.

Nota: Se a centrífuga detetar algum problema aparece uma mensagem de erro no visor do painel de controlo. Comunique de imediato o erro que a centrífuga detetou ao responsável. Este erro deve ser anotado na folha de registo da centrífuga.

11. No final da centrifugação, quando o rotor já estiver parado, ouve-se um sinal sonoro e a porta da centrífuga abre automaticamente.
12. Abra a tampa do rotor de acordo com o indicado anteriormente (passo 3).
13. Retire as suas amostras.
14. No final, proceda à limpeza da centrífuga com papel macio de modo a evitar a acumulação de sujidades.
15. Feche a porta da centrífuga.
16. Desligue a centrífuga (botão na parte de trás do equipamento).
17. Proceda ao registo de utilização na folha que está junto ao equipamento. Se tudo tiver corrido bem, escreva OK no registo.

IMPORTANTE: Se durante a centrifugação ocorrer derrame da sua amostra, lave bem o rotor com água destilada e limpe-o de seguida com papel macio. Nunca utilize detergentes fortes nem escovilhões ou qualquer utensílio que possa danificar o rotor!

I.2. Instruções de utilização da centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R

ANTES DE CENTRIFUGAR: Cuidados com a preparação das amostras

1. Verifique se os tubos de centrífuga que possui são compatíveis com a sua amostra.
2. Verifique se os tubos podem ser utilizados à sua velocidade de trabalho.
3. Escolha o adaptador adequado aos tubos que vai utilizar.
4. Nunca encha totalmente os tubos. Se a amostra couber apenas num tubo, encha outro tubo com água para equilibrar.
5. Equilibre os tubos 2 a 2. Estes tubos têm que ter o mesmo peso (**diferença máxima de 0,09 g**) e aproximadamente a mesma densidade. **IMPORTANTE:** o acerto do peso

dos tubos contendo a sua amostra deve ser feito com os tubos já introduzidos nos adaptadores adequados.

6. Os tubos e respetivos adaptadores devem ser introduzidos no rotor em cavidades diametralmente opostas.

Instruções de funcionamento da centrífuga:

SE É A PRIMEIRA VEZ QUE VAI UTILIZAR A CENTRÍFUGA PEÇA AJUDA A UM DOS INVESTIGADORES OU RESPONSÁVEIS DO LABORATÓRIO. NÃO UTILIZE O EQUIPAMENTO SOZINHO!

1. Ligue a centrífuga no botão azul localizado no lado direito do equipamento. As condições da última centrifugação efetuada são apresentadas.
2. Carregue no botão OPEN para abrir a porta da centrífuga. Ao mesmo tempo que carrega no botão apoie a abertura da porta da centrífuga.





Figura A.1 - Visor e painel de controlo da centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R.

3. Introduza os tubos com a sua amostra já devidamente equilibrados 2 a 2 nos adaptadores adequados em cavidades diametralmente opostas do rotor (ver acima Cuidados com a preparação das amostras).
4. Feche a tampa da centrífuga. A luz do botão OPEN fica azul.
5. Selecione as condições de operação pretendidas:



5.1. **Temperatura:** Carregue no botão TEMP e selecione a temperatura pretendida utilizando as setas  e .



Se necessita de centrifugar a temperaturas baixas, selecione a temperatura de trabalho para esse valor. Feche a porta da centrífuga e espere cerca de 15-20 minutos antes de colocar as suas amostras.

5.2. **Velocidade de centrifugação:** Carregando no botão SPEED o valor de velocidade fica intermitente. Selecione as unidades de velocidade pretendidas (rpm, rcf ou rad) pressionando o botão SPEED repetidamente. Finalmente, selecione a velocidade de centrifugação desejada utilizando as setas  e .

Nota: A velocidade máxima de centrifugação do rotor fornecido com a centrífuga 5810R (código A-4-62) é 4000 rpm!

5.3. **Tempo:** Carregue no botão TIME uma vez e selecione o tempo de centrifugação pretendido (minutos) utilizando as setas  e .


5.3.1. **Velocidade de aceleração:** Carregue novamente no botão TIME para definir a velocidade de aceleração (aparece o símbolo \int seguido de um número entre 0 e 9 que representa o nível de aceleração atual). Pode definir a velocidade de aceleração carregando nas setas  e .

5.3.2. **Velocidade de desaceleração:** Carregue uma vez mais no botão TIME para definir a velocidade de desaceleração (aparece o símbolo \int seguido de um número entre 0 e 9 que representa o nível de desaceleração atual). Pode definir a velocidade de desaceleração carregando nas setas  e .

Nota: Para a maioria das centrifugações é pretendido que a aceleração seja o mais rápida possível para se atingir rapidamente a velocidade máxima de centrifugação (nível 9). Por outro lado, recomenda-se que a desaceleração seja mais lenta para evitar que fases separadas se voltem a misturar (nível 4-5).

6. Verifique todas as condições.
7. Inicie a centrifugação carregando no botão START/STOP. O símbolo ■ aparece intermitente.
8. Não abandone a centrífuga enquanto não se atingir a velocidade máxima que selecionou.

Nota: Se a centrífuga detetar algum problema aparece uma mensagem de erro no visor do painel de controlo. Comunique de imediato o erro que a centrífuga detetou ao responsável. Este erro deve ser anotado na folha de registo da centrífuga.

9. No final da centrifugação, quando o rotor já estiver parado, ouve-se um sinal sonoro e a luz do botão OPEN fica azul.
10. Abra a porta da centrífuga de acordo com o indicado anteriormente (passo 2).
11. Retire as suas amostras.
12. Se pretender utilizar novamente a centrífuga num curto espaço de tempo, coloque-a em Standby carregando no botão .
13. No final, deixe a porta da centrífuga aberta até descongelar e, em seguida, proceda à limpeza da centrífuga com papel macio de modo a evitar a acumulação de água de condensação e sujidades.
14. Deixe secar completamente.
15. Feche a porta.
16. Desligue a centrífuga (botão azul do lado direito).
17. Proceda ao registo de utilização na folha que está junto ao equipamento. Se tudo tiver corrido bem, escreva OK no registo.

IMPORTANTE: Se durante a centrifugação ocorrer derrame da sua amostra, lave os adaptadores bem como o rotor com água destilada e limpe-os de seguida com papel macio. Nunca utilize detergentes fortes nem escovilhões ou qualquer utensílio que possa danificar os adaptadores e o rotor!

I.3. Instruções de utilização do sistema para eletroforese em géis de agarose (Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System – Bio-Rad)

ANTES DE INICIAR A UTILIZAÇÃO DESTE SISTEMA COLOQUE LUVAS E MANTENHA-AS ATÉ AO FINAL DO PROCEDIMENTO.

Os géis de agarose possibilitam a separação e visualização de fragmentos de DNA de diferente tamanho.

1. Verifique se o tabuleiro (“tray”) e os pentes que vai utilizar para a preparação do gel de agarose se encontram devidamente limpos e secos.
2. Determine a quantidade de agarose necessária para preparar a concentração e volume de gel pretendidos.

A concentração de agarose no gel depende do tamanho dos fragmentos de DNA a separar. Por exemplo, para separar fragmentos de DNA de 0,2 a 3 Kb recomenda-se a utilização de um gel com 1,5% (m/v) de agarose.

O volume de gel a preparar depende da espessura de gel pretendida e também do tamanho do tabuleiro. Para o tabuleiro fornecido com este sistema, aconselha-se a preparação de 150 mL de gel.

Exemplo: Para preparar 150 mL de gel com 1,5% (m/v) de agarose, é necessário pesar 2,25 g de agarose.

3. Pese a quantidade de agarose determinada para um frasco Erlenmeyer. Adicione 150 mL de solução tampão TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.0) e aqueça com agitação (barra magnética) até haver completa dissolução da agarose.
4. Deixe arrefecer até conseguir tocar com a mão no frasco Erlenmeyer contendo o gel (50-60 °C). Enquanto esta solução arrefece monte o sistema onde o gel vai polimerizar (Figura A.2).

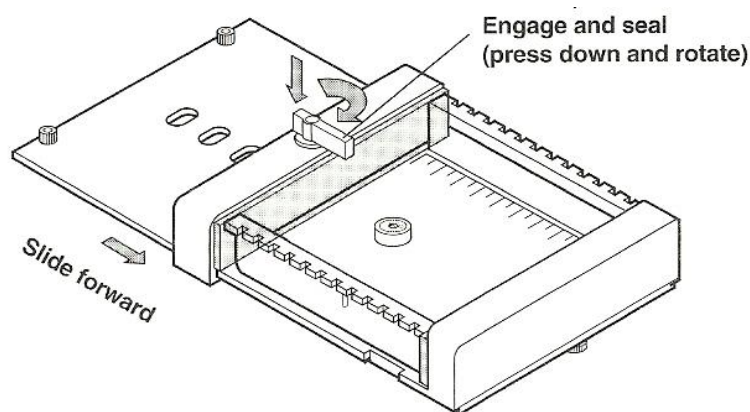


Figura A.2 - “Tray” e “gel caster” para polimerização de géis de agarose.

5. Nivela o “gel caster” utilizando para isso o nível de bolha fornecido e os parafusos colocados na base do “gel caster”.
6. Coloque o “tray” no “gel caster” e aperte a alavanca de modo a vedar completamente e assim evitar fugas de gel enquanto este polimeriza (Figura A.2).
7. Coloque o(s) pente(s) introduzindo-o(s) nas ranhuras existentes no “tray”.
8. Quando o gel de agarose já tiver arrefecido, verta lentamente a solução no “tray” já preparado. Verifique se não se formaram bolhas. Se observar bolhas, remova-as com a ajuda de uma ponta de micropipeta. Deixe polimerizar à temperatura ambiente durante pelo menos 30 min.
9. Remova cuidadosamente o(s) pente(s) do gel já solidificado.
10. Prepare a tina de eletroforese (Figura A.3). Verifique se esta se encontra devidamente limpa e nivelada (nível de bolha e ajuste dos parafusos da base). Encha-a com aproximadamente 1500 mL de tampão TAE 1x.

15. Coloque cuidadosamente a tampa na tina de eletroforese. Tenha cuidado de forma a não danificar as amostras já aplicadas. A tampa encaixa na tina numa única direção: faça corresponder os conectores preto e vermelho da tampa com os da tina.
16. Ligue os cabos preto e vermelho da tampa da tina aos conectores correspondentes na fonte de alimentação (PowerPac™ HC, Bio-Rad, Figura A.4). Assegure-se que a ligação está bem feita.
17. Ligue a fonte de alimentação no botão localizado no lado direito do equipamento.

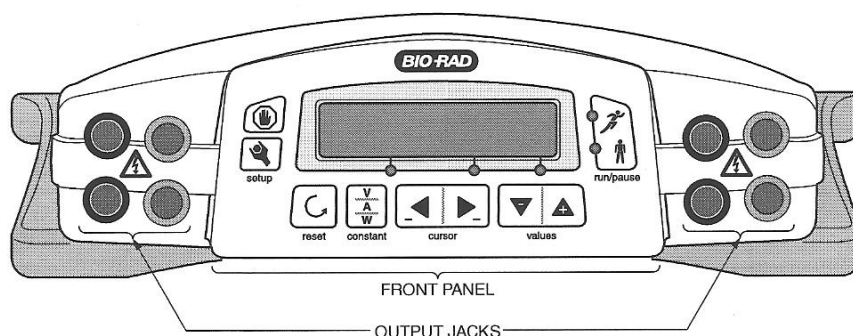



Figura A.4 - Vista frontal da fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-Rad).

18. Selecione as condições de operação pretendidas:
 - a. Carregue no botão CONSTANT para selecionar o parâmetro a manter constante (Voltagem em **V**, Corrente em **A** ou Potência em **W**). Por defeito está selecionada voltagem constante.
 - b. Pressione os botões VALUES – e + para diminuir ou aumentar o valor do parâmetro a manter constante (**Limites máximos: 250 V, 3 A, 300 W**).

Nota: De um modo geral, a voltagem é o parâmetro a manter constante nas eletroforeses de DNA e utilizam-se valores na gama dos 80-100 V.

- c. Utilizando as setas para a direita e para a esquerda localizadas acima de CURSOR mova o cursor para TIME. Defina então o tempo de corrida pretendido utilizando os botões VALUES – e +.

19. Verifique todas as condições.
20. Inicie a corrida de eletroforese carregando no botão RUN/PAUSE .
21. Confirme que está a ocorrer passagem de corrente elétrica pela observação da formação de bolhas junto aos elétrodos na tina de eletroforese.
22. Passado o tempo definido para a corrida, a fonte de alimentação deixa automaticamente de debitar corrente elétrica.
23. Carregue no botão RUN/PAUSE para confirmar o final da corrida.
24. Desligue a fonte de alimentação no botão do lado direito.
25. Desligue os cabos elétricos que ligam a tina à fonte de alimentação.
26. Remova cuidadosamente a tampa da tina de eletroforese e remova o tabuleiro contendo o gel.
27. Proceda à coloração do gel para posterior visualização das bandas de DNA.
 - a. O método de coloração mais utilizado consiste na imersão do gel numa solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 15 a 30 min. No entanto, o brometo de etídio é cancerígeno!
 - b. Como tal, têm vindo a ser desenvolvidos corantes alternativos menos tóxicos e igualmente sensíveis, apesar de mais dispendiosos. Um exemplo desses corantes é o GEL RED. Este corante é vendido numa forma concentrada 10 000x e tanto pode ser incorporado no gel antes da polimerização, como utilizado para preparar uma solução na qual o gel é imerso após a eletroforese (concentração final de GEL RED: 1x).
28. Coloque o gel num transiluminador-UV (254 nm) e proceda à visualização e análise das bandas de DNA.
29. Fotografe o gel para registo.

LIMPEZA E MANUTENÇÃO

Proceda periodicamente à limpeza da tina de eletroforese e dos respetivos acessórios. Todos os componentes do sistema Sub-Cell GT devem ser lavados com um detergente suave muito diluído.

I.4. Instruções de utilização do sistema para electroforese em géis de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® 3 Cell- Bio-Rad)

ANTES DE INICIAR A UTILIZAÇÃO DESTE SISTEMA COLOQUE LUVAS E MANTENHA-AS ATÉ AO FINAL DO PROCEDIMENTO.

A eletroforese em géis de poliacrilamida possibilita a separação de moléculas em misturas complexas de acordo com o seu tamanho e carga.

A. Montagem do sistema de vidros e preparação dos géis

1. Verifique se os suportes, vidros e pentes que vai utilizar para a preparação dos géis de acrilamida se encontram devidamente limpos e secos.
2. O sistema de vidros onde vai preparar os géis é constituído por um vidro maior com “spacers” (definem a espessura do gel) e um vidro mais pequeno. Coloque um vidro pequeno sobre um vidro com “spacers” (Figura A.5) de modo a que as letras fiquem para cima. Insira este conjunto na “casting frame” (peça verde em plástico que mantém os dois vidros unidos) e, em seguida, trave a “casting frame” movendo as duas abas laterais para fora (Figuras A6(A) e A6(B)). Assegure que o vidro pequeno fica virado para a frente.

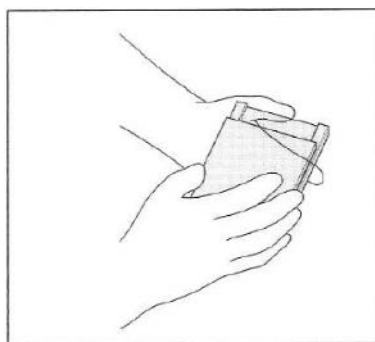


Figura A.5 - Montagem do sistema de vidros para preparação do gel de acrilamida.

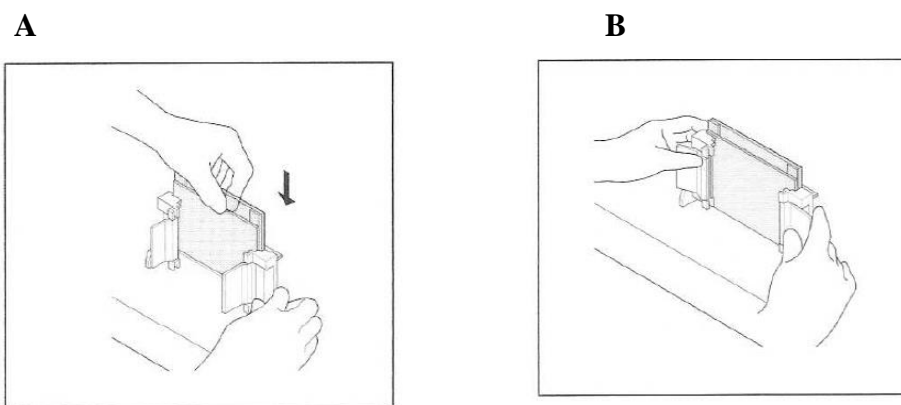


Figura A.6 - Introdução do sistema de vidros na “casting frame” (A) e bloqueio da mesma (B) para assegurar que os vidros de mantêm unidos.

3. Coloque a “casting frame” no suporte para polimerização dos géis (Figura A.7). Utilize a mola presente na parte de cima do suporte para prender o vidro maior e assegure-se que os vidros estão perpendiculares em relação à esponja existente na base do suporte. Deste modo garante-se que não haverá fugas de gel.

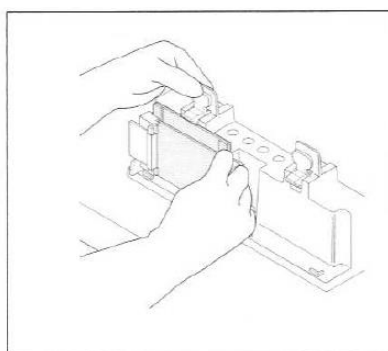


Figura A.7 - Colocação da “casting frame” no suporte para polimerização dos géis.

4. Repita os passos 1 a 3 para montagem de um segundo sistema de vidros.
5. Prepare o gel de resolução (“resolving gel”) misturando os seus diferentes componentes (ver o exemplo abaixo). O gel de resolução pode ter diferentes concentrações de Acrilamida/Bis dependendo das moléculas que se pretendem separar.

Exemplo da composição de um gel de resolução (12,5% Acrilamida/Bis, $V_{\text{total}}=10$ mL):

- Acrilamida/Bis 30% - 4,2 mL
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 – 2,5 mL

- H₂O destilada – 3,2 mL
- SDS 10% (m/v) – 0,1 mL

6. Depois de homogeneizar bem todos os componentes, adicione os agentes de polimerização: para um volume de gel de 10 mL adicione 50 µL de persulfato de amônia 10% (m/v) e 5 µL de TEMED. Homogeneize cuidadosamente para iniciar o processo de polimerização.

7. Transfira **imediatamente** esta solução para o sistema de vidros com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL até atingir ≈1,5-2 cm abaixo do limite/topo do vidro mais pequeno.

8. Coloque uma fina camada de água destilada sobre a solução de gel de resolução (já nos vidros) de modo a garantir a formação de uma superfície plana.

9. Deixe polimerizar durante 45-60 min.

10. Lave abundantemente a superfície do gel de resolução já polimerizado com água destilada.

11. Remova o excesso de água destilada com papel de filtro.

12. Prepare o gel de concentração (“stacking gel”) misturando os seus diferentes componentes (ver o exemplo abaixo). Tal como o gel de resolução, o gel de concentração pode ter diferentes concentrações de Acrilamida/Bis dependendo das moléculas que se pretendem separar.

Exemplo da composição de um gel de concentração (4% Acrilamida/Bis, V_{total}=10 mL):

- Acrilamida/Bis30% - 1,3 mL
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 – 2,5 mL
- H₂O destilada – 6,1 mL
- SDS 10% (m/v) – 0,1 mL

13. Depois de homogeneizar bem todos os componentes, adicione os agentes de polimerização: para um volume de gel de 10 mL adicione 50 µL de persulfato de amônia

10% (m/v) e 10 μL de TEMED. Homogeneize cuidadosamente para iniciar o processo de polimerização.

14. Transfira **imediatamente** esta solução para o sistema de vidros (já contendo o gel de resolução) com o auxílio de uma micropipeta de 1000 μL até atingir o topo do vidro mais pequeno.

15. Insira o pente entre os “spacers” para permitir a formação dos poços.

16. Deixe polimerizar durante 30-45 min.

17. Remova cuidadosamente o pente do gel já polimerizado.

18. Lave os poços abundantemente com água destilada de modo a remover resíduos de acrilamida não polimerizada.

B. Aplicação das amostras e electroforese

1. Remova os vidros com os géis de poliacrilamida polimerizados do suporte e em seguida da “casting frame” rodando as abas laterais para dentro (Figura A.8).

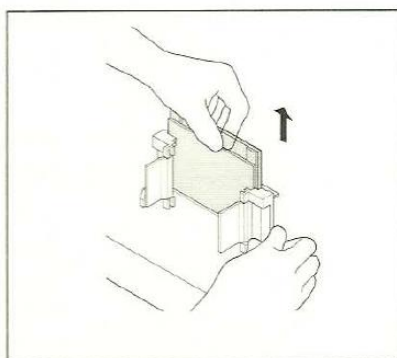


Figura A.8 - Remoção do sistema de vidros da “casting frame”.

2. Encaixe os sistemas de vidros no suporte com os elétrodos de modo a que o vidro mais pequeno fique virado para dentro (Figura A.9).

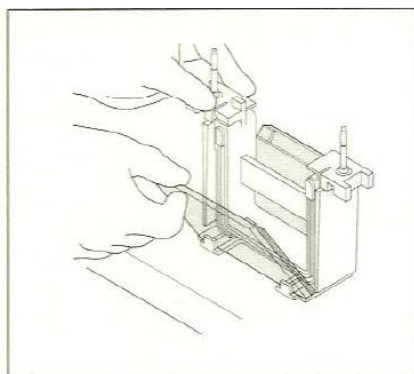
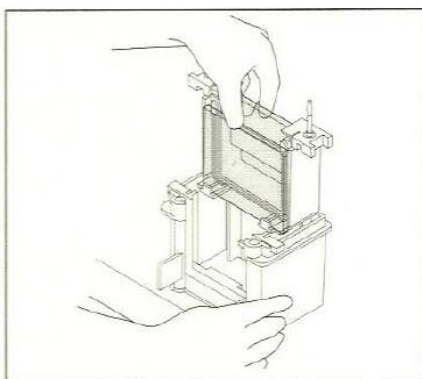


Figura A.9 - Introdução do sistema de vidros no suporte com os elétrodo.

3. Introduza o conjunto vidros+suporte com elétrodo na “clamping frame” (Figura A10(A)). Faça pressão sobre os vidros+elétrodo e, ao mesmo tempo, rode as abas laterais da “clamping frame” para dentro (Figura A10(B)). Deste modo garante que todo o sistema fica bem vedado e fica assim criada a câmara de eletroforese interior.

A



B

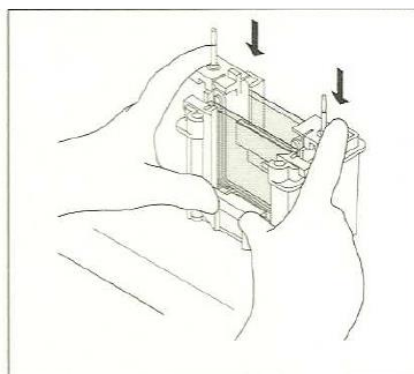


Figura A.10 - Introdução dos vidros+elétrodo na “clamping frame” (A) e procedimento para manter o sistema fechado e bem vedado (B).

4. Coloque toda a montagem dentro do tanque de eletroforese (Figura A11).

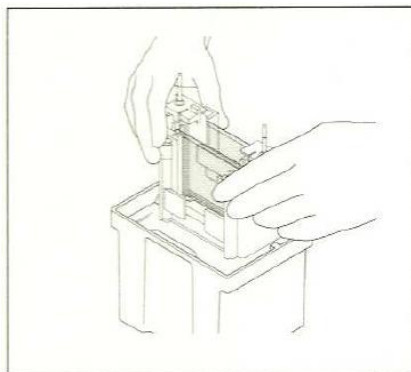


Figura A.11 - Introdução da câmara de eletroforese interior no tanque.

5. Encha a câmara de eletroforese interior com ≈ 125 mL de tampão de corrida (ver composição em baixo).

Exemplo da composição do tampão de corrida:

- 3 g/L Tris base
- 14,4 g/L Glicina
- 3 g/L SDS

6. Em seguida, encha o tanque de eletroforese com ≈ 200 mL de tampão de corrida (câmara de eletroforese exterior).
7. Prepare as suas amostras para aplicação no gel. Para isso, aqueça um determinado volume da sua amostra a 95°C durante 5 min e, em seguida, adicione “sample buffer” (ex. “sample buffer according to Laemmli”, SIGMA, ref. 11337) que é constituído por azul de bromofenol (confere cor), glicerol (confere densidade), SDS e 2-mercaptoetanol. O volume a adicionar de cada componente depende da concentração das soluções.
8. Proceda à aplicação das suas amostras nos poços do gel usando para isso uma microseringa ou uma micropipeta com pontas capilares.
9. Coloque cuidadosamente a tampa no tanque de eletroforese. Tenha cuidado de forma a não danificar as amostras já aplicadas. A tampa encaixa no tanque numa única direção: faça corresponder os conectores preto e vermelho da tampa com os da tina.

10. Ligue os cabos preto e vermelho da tampa do tanque aos conectores correspondentes na fonte de alimentação (PowerPac™ HC, Bio-Rad, Figura A.12). Assegure-se que a ligação está bem feita.
11. Ligue a fonte de alimentação no botão localizado no lado direito do equipamento.

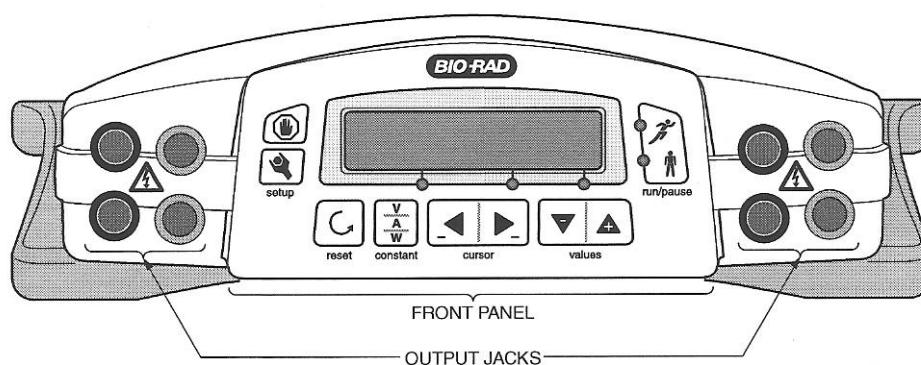



Figura A.12 - Vista frontal da fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-Rad).

12. Selecione as condições de operação pretendidas:
 - a. Carregue no botão **CONSTANT** para seleccionar o parâmetro a manter constante (Voltagem em **V**, Corrente em **A** ou Potência em **W**). Por defeito está seleccionada voltagem constante.
 - b. Pressione os botões **VALUES** – e + para diminuir ou aumentar o valor do parâmetro a manter constante (**Limites máximos: 250 V, 3 A, 300 W**).

Nota: De um modo geral, a voltagem é o parâmetro a manter constante nas eletroforeses. Em SDS-PAGE utilizam-se valores na gama dos 200 V.

- c. Utilizando as setas para a direita e para a esquerda localizadas acima de **CURSOR**, mova o cursor para **TIME**. Defina então o tempo de corrida pretendido utilizando os botões **VALUES** – e +.

13. Verifique todas as condições.

14. Inicie a corrida de eletroforese carregando no botão **RUN/PAUSE** .
15. Confirme que está a ocorrer passagem de corrente elétrica pela observação da formação de bolhas junto aos elétrodos do tanque de eletroforese.
16. Passado o tempo definido para a corrida, a fonte de alimentação deixa automaticamente de debitar corrente elétrica.
17. Carregue no botão **RUN/PAUSE** para confirmar o final da corrida.
18. Desligue a fonte de alimentação no botão do lado direito.
19. Desligue os cabos elétricos que ligam o tanque à fonte de alimentação.
20. Remova cuidadosamente a tampa do tanque de eletroforese e retire a “clamping frame” contendo os géis.
21. Proceda à desmontagem de todo o sistema de acordo com o indicado anteriormente. Para separar o vidro maior com “spacers” do vidro mais pequeno utilize o “Gel Releaser” (peça de plástico verde) fornecido com o equipamento.
22. Proceda à coloração/descoloração do gel para posterior visualização do perfil de bandas.
- d. Para coloração/descoloração de géis de proteínas SDS-PAGE, estes são imersos numa solução corante de Coomassie Blue R-250 seguido de lavagem com uma solução descolorante contendo ácido acético, etanol e água. A composição das soluções corante e descolorante pode variar ligeiramente entre protocolos.
23. Fotografe o gel para registo.
24. No final, lave todo o material com água e água destilada. Os vidros podem ser lavados com detergente muito diluído e água destilada.

I.5. Instruções de utilização do Instruções de utilização do termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad)

Leia este manual antes de utilizar o equipamento. As secções A a C referem-se ao arranque do termociclador, criação e edição de programas de temperaturas. Só depois de ter cumprido estes procedimentos, pode passar à introdução das suas amostras e execução do programa para amplificação (secção D).

A. Arranque e opções do equipamento

1. Ligue o termociclador na ficha e depois no botão localizado na parte de trás do equipamento (Figura A.13). A ventoinha do equipamento liga-se, é emitido um sinal sonoro e iniciam-se uma série de testes de arranque.

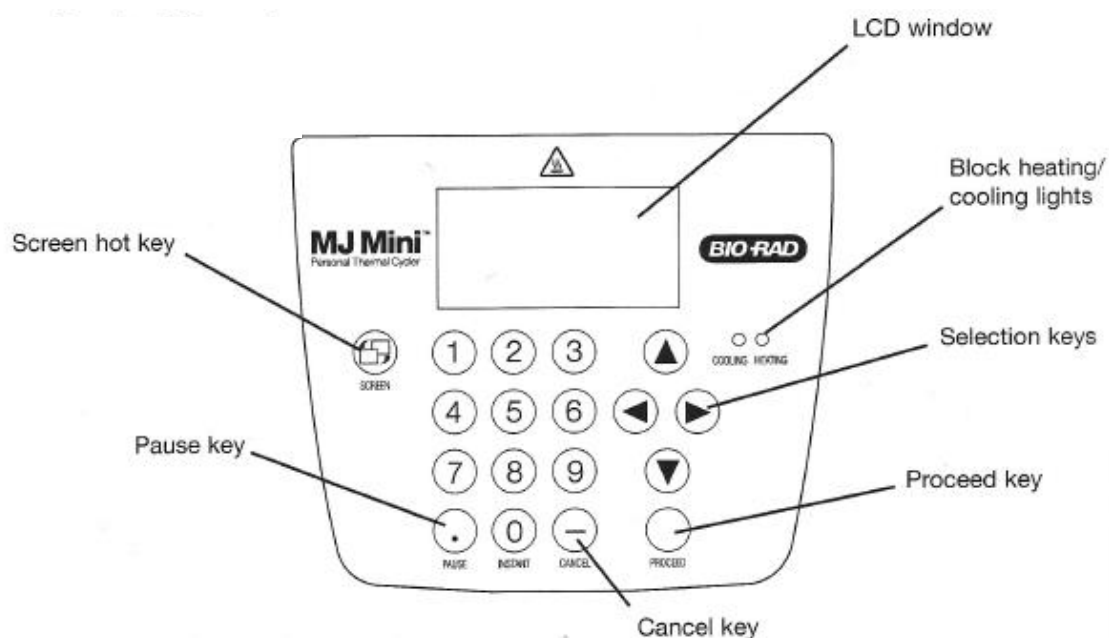


Figura A.13 - Vista frontal do termociclador MJ Mini Cyclor.

2. Se os testes iniciais não detetarem nenhum problema, aparece o MENU PRINCIPAL no visor do painel de controlo (Figura A.13(A)). Na parte de baixo do visor aparece escrito “Block is idle” indicando que não está a ser executado nenhum ciclo. Em cima aparecem as seguintes opções: RUN, NEW, EDIT, VIEW, FILES, TOOLS (Figura A.13(B)).

- a. **RUN:** executa um programa.
- b. **NEW:** permite a criação de novos programas.
- c. **EDIT:** permite modificar programas já criados.
- d. **VIEW:** permite visualizar os diferentes passos de um programa já gravado.
- e. **FILES:** permite aceder a funções de gestão do equipamento.
- f. **TOOLS:** permite aceder à configuração do equipamento.

A



B

RUN	VIEW
NEW	FILES
EDIT	TOOLS
Block is idle	

Figura A.14 - Pannel de controlo do termociclador MJ Mini Cycler (A) e pormenor do menu principal no visor (B).

B. Criação de um novo programa de temperaturas

1. No menu principal, selecione com as setas a opção **NEW** e em seguida carregue no botão **PROCEED/ENTER** do painel de controlo (Figuras A.14(A) e (B)).
2. Atribua um nome (até 8 caracteres) ao programa que vai criar. Para isso, utilize as setas **▲** e **▼** para percorrer o alfabeto. Quando já tiver selecionado a letra pretendida, carregue no botão **PROCEED/ENTER** para aceitar este caractere e passar ao próximo. Pode utilizar números e pontos no nome do seu programa. Para isso, utilize o teclado do painel de controlo. Para apagar ou corrigir algum dos caracteres, carregue no botão **CANCEL** do painel de controlo (Figura A.14(A)).
3. Depois de introduzir o último caractere, carregue no botão **PROCEED/ENTER** para aceitar este caractere e, em seguida, carregue novamente neste botão para aceitar o nome completo.
4. Selecione a temperatura da tampa do termociclador durante o programa de PCR. Aconselha-se que esta temperatura seja superior ao valor mais elevado que vai usar no seu programa de temperaturas (Ex. 100 °C). Confirme o valor introduzido carregando em **PROCEED/ENTER**.
5. Especifique o volume das suas reações (1-100 µL) e confirme com o botão **PROCEED/ENTER**.
6. Comece a introduzir os passos do seu programa de temperaturas. Numa reação de PCR existem geralmente as seguintes etapas:

»**Passo 1** - Desnaturação inicial (92-96 °C/2-5 min)

»Ciclo de amplificação:

-Desnaturação (92-96 °C, **passo 2**)

-Annealing (34-65 °C, **passo 3**)

-Extensão (72 °C, **passo 4**)

A duração de cada fase do ciclo pode variar entre 30 s e 2 min. Este ciclo é repetido 30-45 vezes (**passo 5**)

»Extensão final (72 °C/10-30 min, **passo 6**)

Tendo isto em conta, selecione (com as setas ◀ e ▶) entre um passo 1 (desnaturação inicial) a temperatura constante (**TEMP**) ou com gradiente de temperaturas (**GRAD**). Quando se utiliza gradiente, as diferentes linhas de poços do bloco do termociclador vão aquecer a temperaturas distintas (ver abaixo, secção E). Selecione temperatura constante (**TEMP**) e confirme a sua escolha com **PROCEED/ENTER**.

7. Em seguida, introduza o valor de temperatura em °C (**TEMP °C**). Confirme com **PROCEED/ENTER**.

8. Defina a duração deste passo 1. À frente de **TIME** escreva o valor de tempo pretendido. Confirme com **PROCEED/ENTER**.

Ex: Se escrever 30, o passo durará 30 segundos. Se pretende 2 minutos de duração, digite 2 0 0.

9. Na parte de baixo do visor aparece um menu de confirmação (**OK?**). Selecione **YES** (com as setas ◀ e ▶) e confirme com **PROCEED/ENTER**. O programa passa automaticamente para o passo 2 (fase de desnaturação do ciclo de amplificação).

10. Proceda do mesmo modo que descrito anteriormente para o passo 1 (tópicos 6 a 9) e assim sucessivamente até ao passo 4 (fase de extensão do ciclo de amplificação).

11. Depois de ter introduzido as 3 fases do ciclo de amplificação (passos 2, 3 e 4), é necessário indicar o número de vezes que pretende que este ciclo seja repetido. Para isso tem que introduzir um “**Goto Step**”.

11.1. Após confirmar o passo 4 com **PROCEED/ENTER**, entre as opções que surgem para o passo seguinte (passo 5), selecione **GOTO**.

11.2. À frente de **GOTO STEP** digite o número do passo onde quer iniciar a repetição (neste caso o passo 2). Confirme com **PROCEED/ENTER**.

11.3. À frente de **ADDTNL CYCLES** introduza o número de vezes que pretende repetir os passos 2, 3 e 4. Confirme com **PROCEED/ENTER**.

Ex: Se pretende realizar 35 ciclos de amplificação, digite 34.

11.4. Proceda à confirmação final deste passo (**OK? YES**).

12. Para definir o passo 6 (extensão final), proceda do mesmo modo que descrito anteriormente para os passos 1 a 4 (tópicos 6 a 10).

13. Introduza um passo 7 de refrigeração para garantir a conservação das suas amostras. Para isso, digite 4 °C no campo **TEMP °C** e ∞ no campo **TIME**.

Nota: Para introduzir ∞ , carregue na tecla **0** e em seguida **PROCEED/ENTER**.

14. Finalmente, introduza o passo que termina o programa (**END STEP**). Após confirmar o passo 7 com **PROCEED/ENTER**, entre as opções que aparecem para o passo seguinte (passo 8), selecione **END**. Confirme com **PROCEED/ENTER** e em seguida **YES**.

15. A criação do seu programa está concluída!

C. Como editar um programa de temperaturas já criado

1. No menu principal, selecione com as setas a opção **EDIT** e em seguida carregue no botão **PROCEED/ENTER** do painel de controlo (Figuras A.14(A) e (B)).

2. Aparece uma lista dos programas disponíveis na pasta **MAIN** do termociclador. Selecione com as setas o programa que pretende editar. Confirme carregando em **PROCEED/ENTER**.

3. No visor do painel de controlo aparecem os diferentes passos que constituem o programa a editar.

4. Utilizando as setas **▲** e **▼** pode percorrer os diferentes passos do programa. O cursor move-se progressivamente para o número do passo, temperatura correspondente e tempo.

5. Para introduzir alterações num passo em específico, mova o cursor para a condição (temperatura/tempo) desse passo que pretende editar, digite o novo valor e carregue em **PROCEED/ENTER**.

6. Para adicionar ou remover um passo, posicione o cursor no número do passo (1, 2, 3, ...) e pressione o botão **PROCEED/ENTER**.

7. Aparecem as seguintes opções: **INS**, **DEL**, **EDIT**, **OPTION**.

7.1. Para inserir um passo, pressione **INS** e, em seguida, **PROCEED/ENTER**. O novo passo será adicionado antes do passo que selecionou.

7.2. Para remover o passo selecionado, pressione **DEL** e, em seguida, **PROCEED/ENTER**.

8. Para gravar as alterações que introduziu no seu programa, use as setas para mover o cursor até ao último passo (**END**). Carregue em **PROCEED/ENTER**. Aparecem duas opções no fundo do visor: **END** e **INSERT**. Selecione **END** para gravar as alterações e regressar ao menu principal. Confirme com **PROCEED/ENTER**.

D. Introdução de amostras no termociclador e execução de um programa

1. Depois de ter ligado e efetuado o arranque do equipamento (secção A) abra a tampa “heated lid” para poder introduzir as suas amostras (Figura A.13). Para abrir a tampa, puxe-a firmemente para cima e para trás.

2. Introduza os tubos com as suas reações de PCR nos poços do bloco do termociclador. **Tenha o cuidado de dispor os tubos de forma simétrica. Se tiver poucas amostras, coloque um tubo de PCR vazio em cada canto do bloco.** Estes procedimentos são essenciais para garantir que, quando fechar a tampa, esta vai exercer pressão homogênea sobre todos os tubos. O termociclador MJ Mini permite a amplificação simultânea de 48 amostras.

3. Feche a tampa do equipamento. Para isso, puxe-a para a frente e para baixo até ouvir um clique.

4. Ajuste a peça rotativa verde (“thumbwheel”) para se assegurar que, no interior do equipamento, a “heated lid” vai entrar em contacto com os tubos. Rode a peça rotativa verde no sentido dos ponteiros do relógio até sentir resistência. Isto indica que a “lid” entrou em contacto com os tubos.

5. No menu principal selecione **RUN** e confirme com **PROCEED/ENTER**.

6. Utilize as setas para mover o cursor para o programa que pretende executar e, em seguida, pressione **PROCEED/ENTER**.

7. Na linha de cima do visor aparece **RUN** seguido do nome do programa selecionado. Abaixo aparece o volume de reação (**SAMPLE VOL**). Introduza o volume das suas reações e confirme com **PROCEED/ENTER**.
8. O cursor passa automaticamente para **RUN**. Confirme novamente com **PROCEED/ENTER**. O programa começa a ser executado.
9. Durante a execução do programa, se pressionar o botão **SCREEN** (Figura A.14(A)), pode alternar entre diferentes tipos de visualização:
 - » Passo do programa que está a ser executado
 - » Gráfico da rampa de temperaturas
 - » Tempo restante para o final do programa
10. No final, quando o passo de refrigeração já estiver a ser executado há pelo menos 15 min, pode terminar o programa. Carregue em **PROCEED/ENTER**, confirme com **YES** e pressione novamente **PROCEED/ENTER** para regressar ao Menu Principal.
11. Desligue o termociclador no botão localizado na parte de trás do equipamento.
12. Abra a tampa tal como descrito anteriormente (ponto 1) e retire as suas amostras. Volte a fechar a tampa.
13. Desligue o equipamento da tomada.
14. Proceda ao registo de utilização na folha que está junto ao equipamento. Se tudo tiver corrido bem, escreva OK no registo.

E. Utilização de gradiente de temperaturas no protocolo de amplificação

1. Pode utilizar um gradiente de temperaturas na amplificação das suas amostras. Quando se utiliza gradiente, isso significa que as diferentes linhas de poços do bloco do termociclador (8 linhas) vão aquecer a temperaturas diferentes.
2. Na criação ou edição do programa de temperaturas (secções B e C), quando chegar ao passo onde pretende utilizar gradiente, selecione **GRAD** (Figura A.15). Confirme com **PROCEED/ENTER**.

New:	Lid: 100 °C
ABCD	Vol: 20 µL
1=92.0 °C FOR 0:30	
2=TEMP GRAD GOTO END	

Figura A.15 - Exemplo de criação de um programa de temperaturas com gradiente.

3. Em seguida, à frente de **LOWER TEMP °C**, introduza o limite inferior do intervalo de temperaturas a utilizar no gradiente. Confirme com **PROCEED/ENTER**.
4. À frente de **UPPER TEMP °C**, introduza o limite superior do intervalo de temperaturas a utilizar no gradiente. Confirme com **PROCEED/ENTER**.
5. Finalmente, à frente de **TIME**, defina a duração deste passo. Confirme com **PROCEED/ENTER, YES** e novamente **PROCEED/ENTER**.

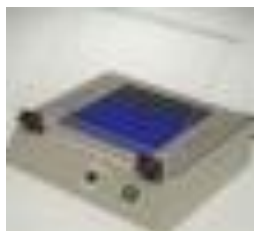
I.6. Instruções de utilização do transiluminador

1. Comece por incorporar a máquina fotográfica encaixando-a no topo superior da campânula e apertando o parafuso até fixar bem a máquina.
2. Ligue os dois cabos existentes à máquina fotográfica.



3. Depois de montada, pegue na parte superior da campânula recorrendo às duas asas em inox existentes nas partes laterais do aparelho e pouse-a na banca ao lado, de forma a expor o transiluminador.

4. Coloque, com o auxílio de LUVAS, o gel de agarose na parte superior do transiluminador.



5. Pegue na campânula e reponha-a na localização inicial.

6. Ligue a campânula no botão vermelho **POWER**, situado no topo lateral direito do aparelho.



7. Ligue o transiluminador acionando o interruptor verde frontal do transiluminador para a posição **I**.

8. Selecione o comprimento de onda pretendido (254 ou 312 nm) no botão preto, localizado à esquerda do interruptor premindo anteriormente.

9. Ligue a máquina fotográfica. O visor frontal irá ligar-se automaticamente.



Para ligar a máquina rode este botão para a direita até à posição ON.

Para tirar a foto carregue no mesmo botão.

10. Retratar premindo o botão anterior da máquina fotográfica.

11. No final da utilização, desligue o transiluminador, acionando o interruptor verde frontal para a posição **0**.
12. Desligue a campânula botão vermelho **POWER**, situado no topo lateral direito do aparelho.
13. Desligar a máquina fotográfica, retirar os cabos e guardar a máquina fotográfica.
14. Proceda ao registo de utilização do aparelho na folha destinada a este efeito.

LIMPEZA E MANUTENÇÃO:

- Deixe todo o equipamento impecavelmente limpo.
- Utilize LUVAS para retirar o gel e limpe o painel delicadamente com água destilada e papel suave.

I.7. Instruções de utilização do Leitor de Microplacas Biotek Synergy HT

As instruções que se seguem são um breve manual para facilitar a utilização do equipamento, não invalidando a consulta do manual de instruções que o acompanha sempre que se justifique.

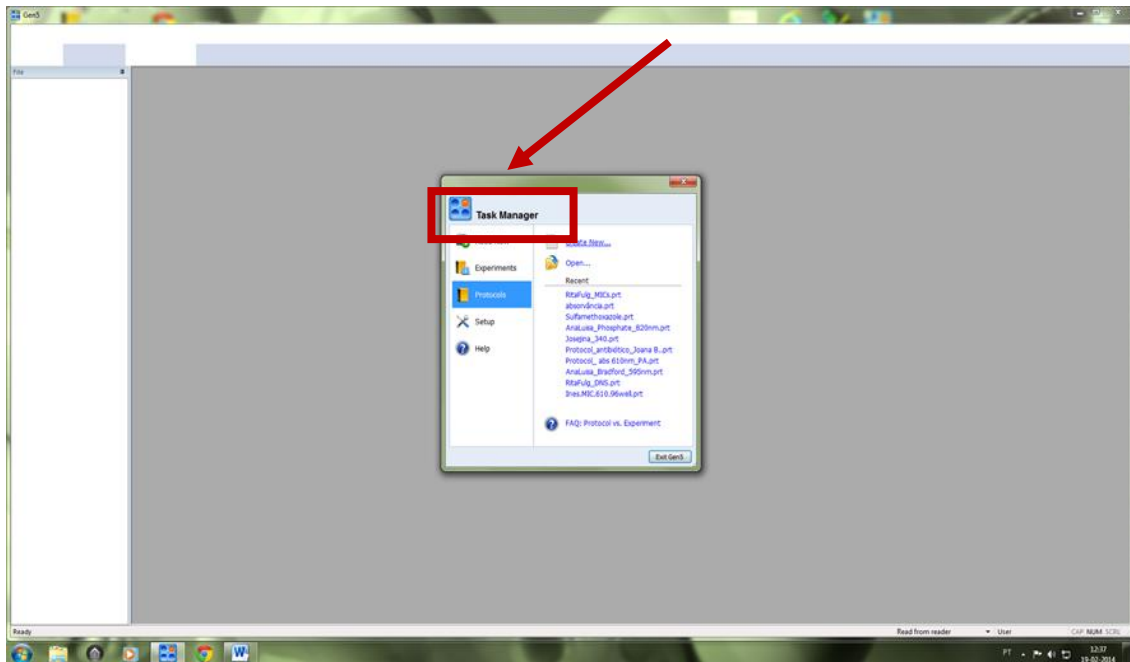
Antes de iniciar a utilização do equipamento deverá ligar o equipamento no botão **ON/OFF** localizado no canto inferior esquerdo do equipamento.



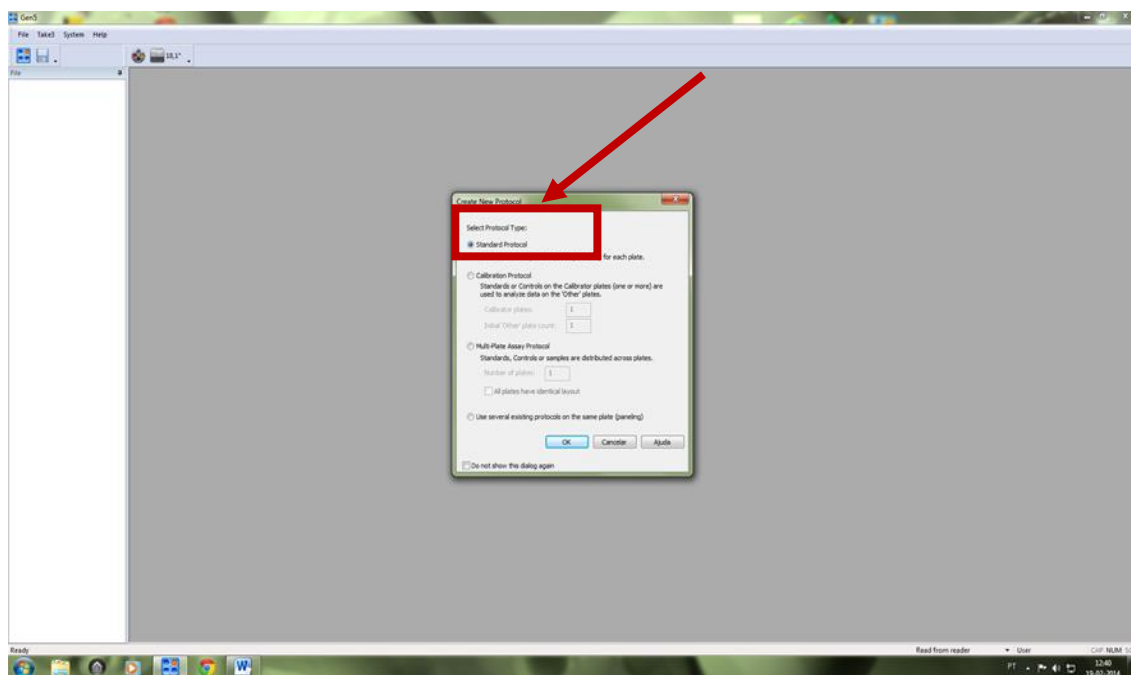
Ligue o computador e abra o programa **Gen 5 2.00**.



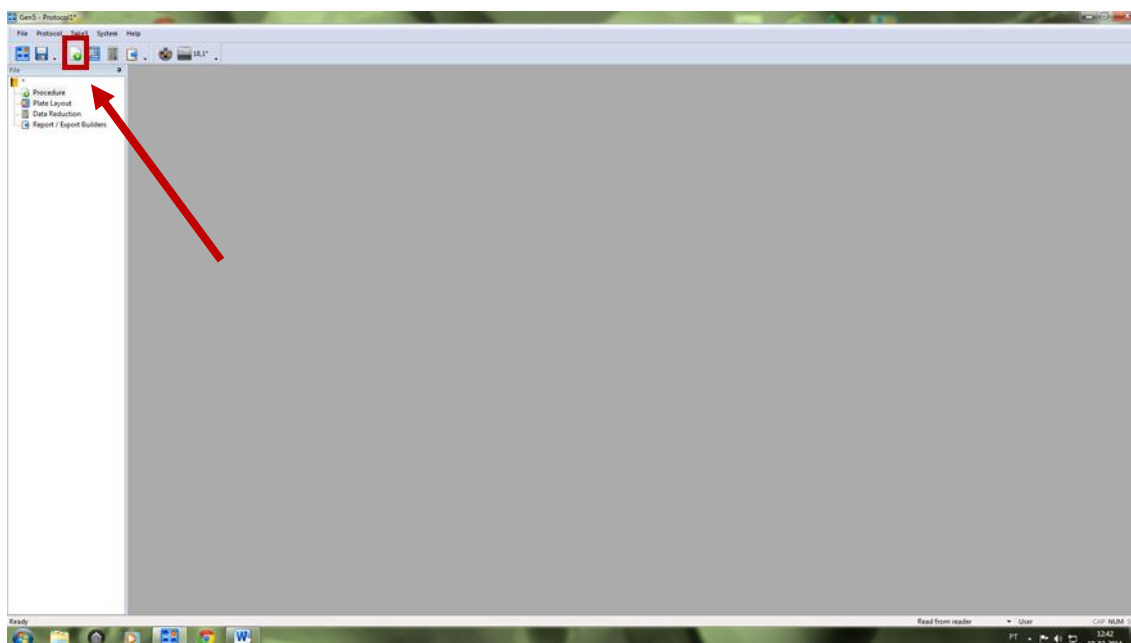
1. No menu **Task Manager**, selecione a opção **Protocols** seguido de **Create New**.
(Caso já tenha um protocolo criado escolha a opção **Open** e prossiga).



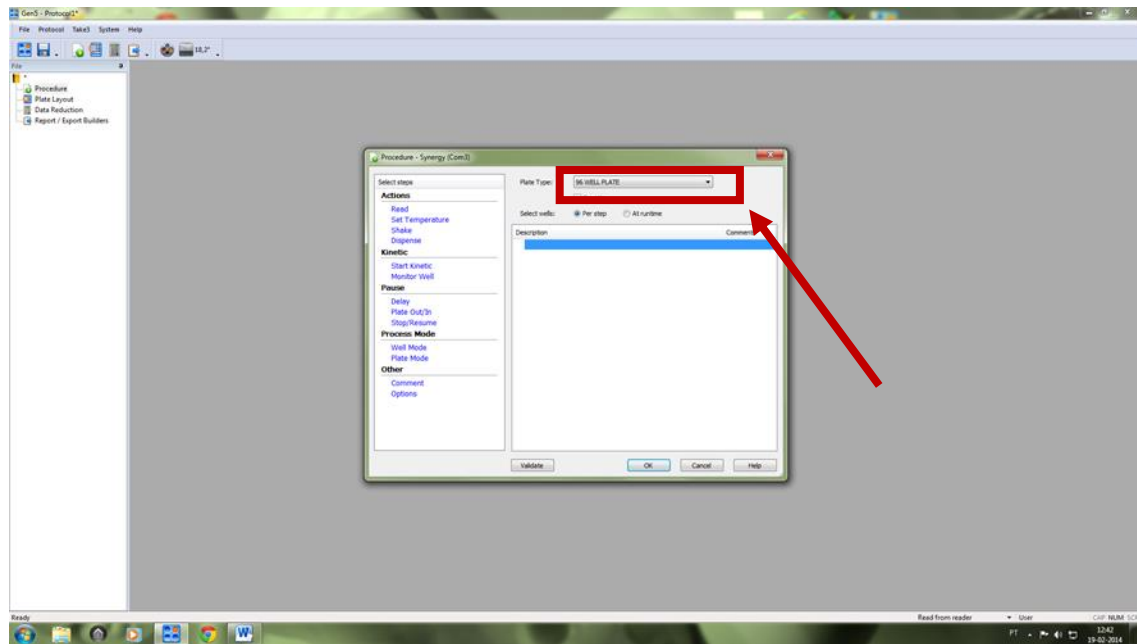
2. Selecione **Standard Protocol**.
3. Valide clicando em **OK**.



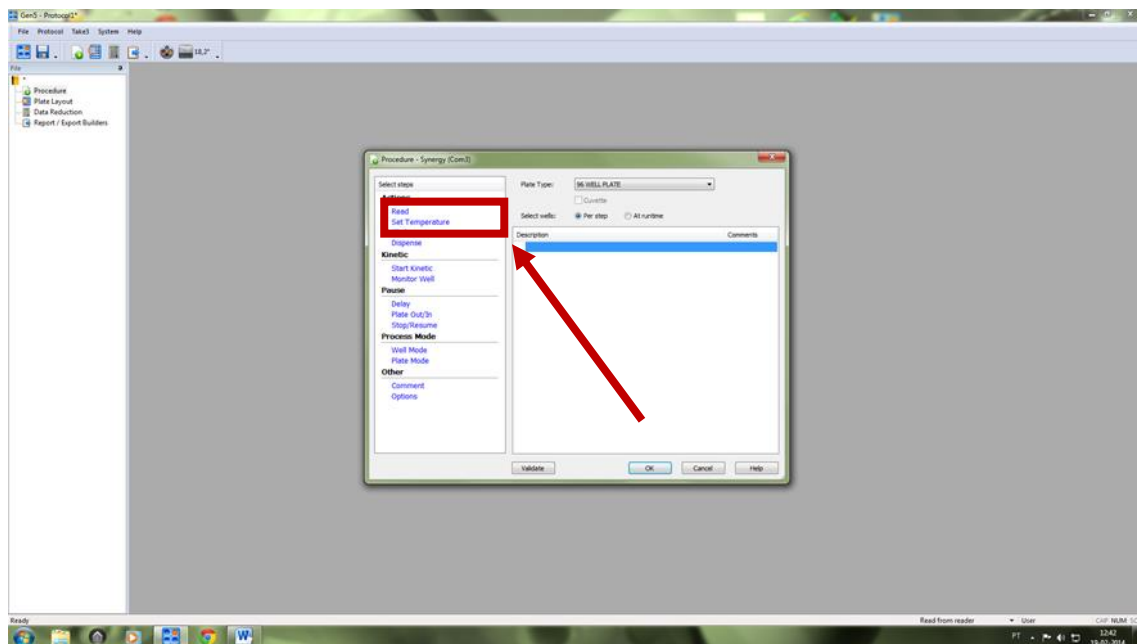
4. Clique em **Procedure** selecionando o icon identificado a vermelho para prosseguir.

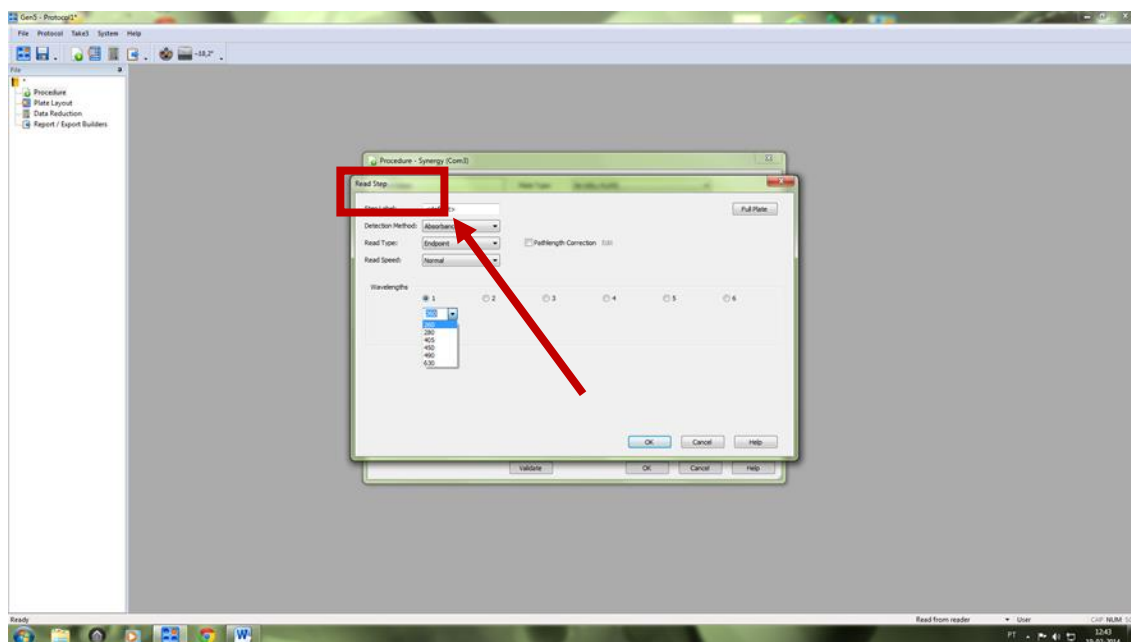


5. Escolha o tipo de placa que vai utilizar em **Plate Type** (96 Well Plate).

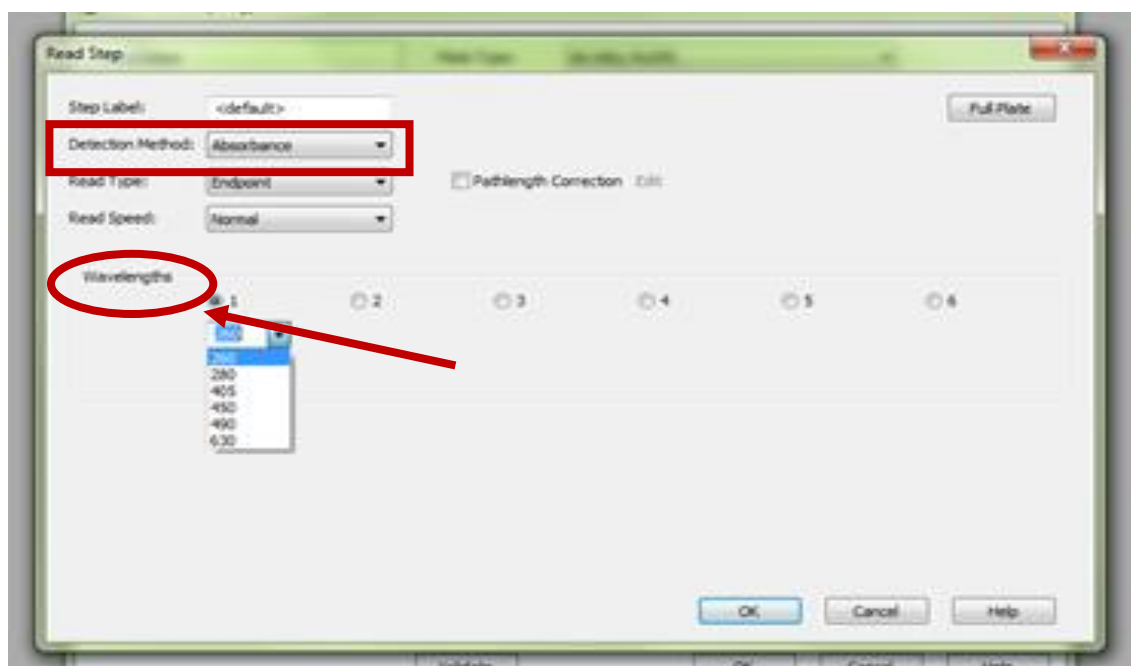


6. No menu **Actions** seleccione **Read** e surgirá o menu **Read Step**:

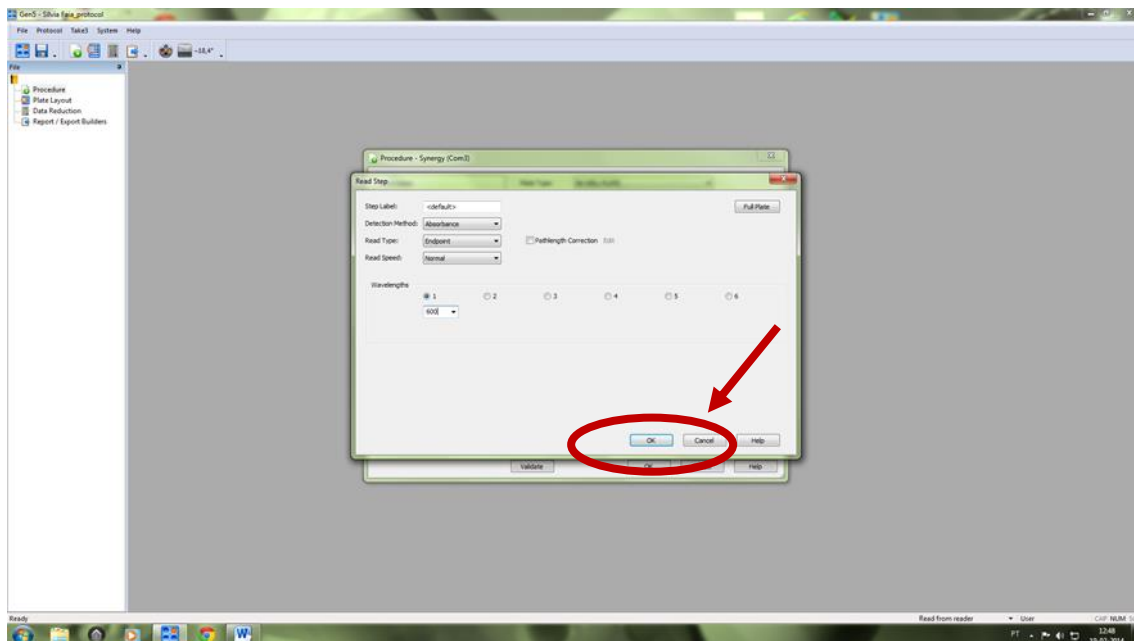




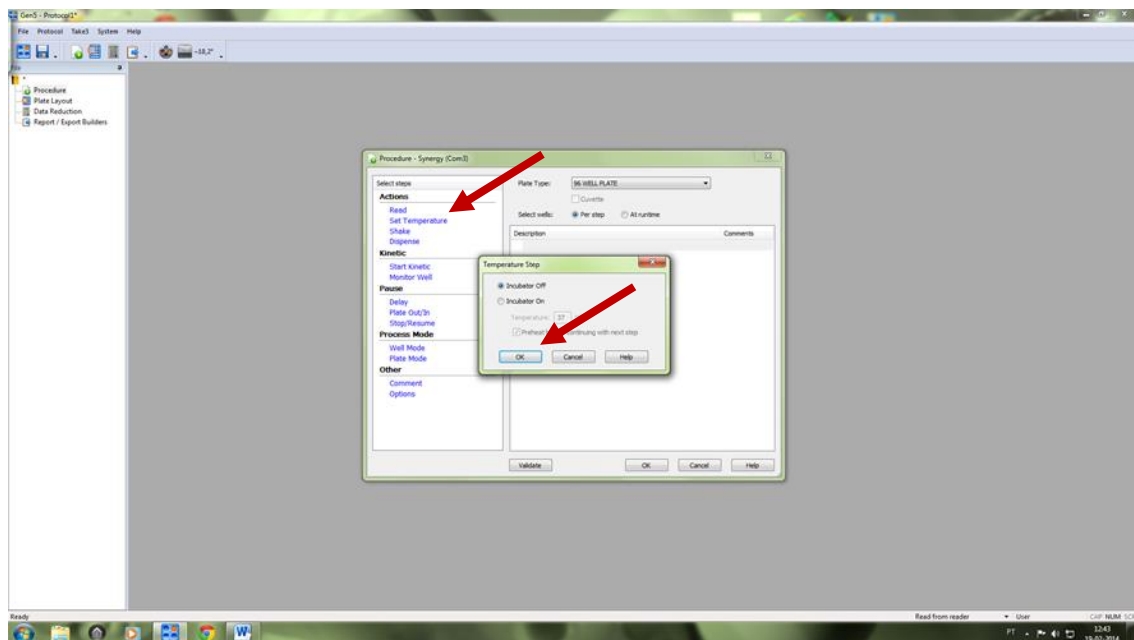
7. Em **Detection Method** escolha o parâmetro que pretende ler: Absorvância (ir para o ponto 8) ou Fluorescência (ir para o ponto 21).



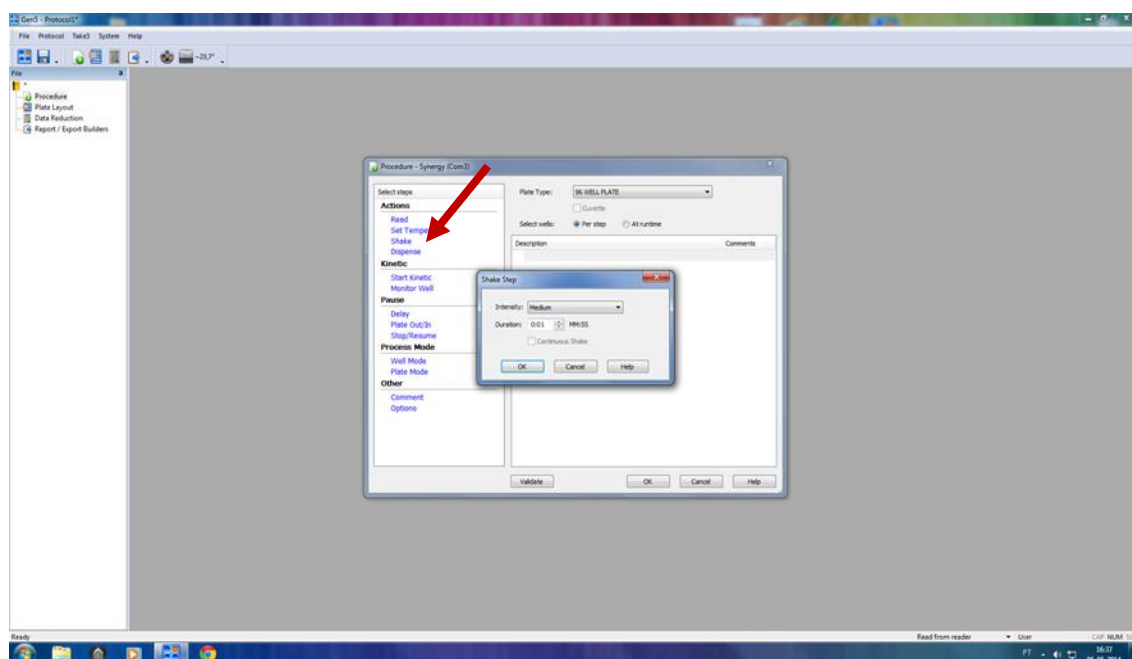
8. Para ler absorvância selecione **Absorbance**, escolha o comprimento de onda pretendido em **Wavelengths** e valide com **OK**.



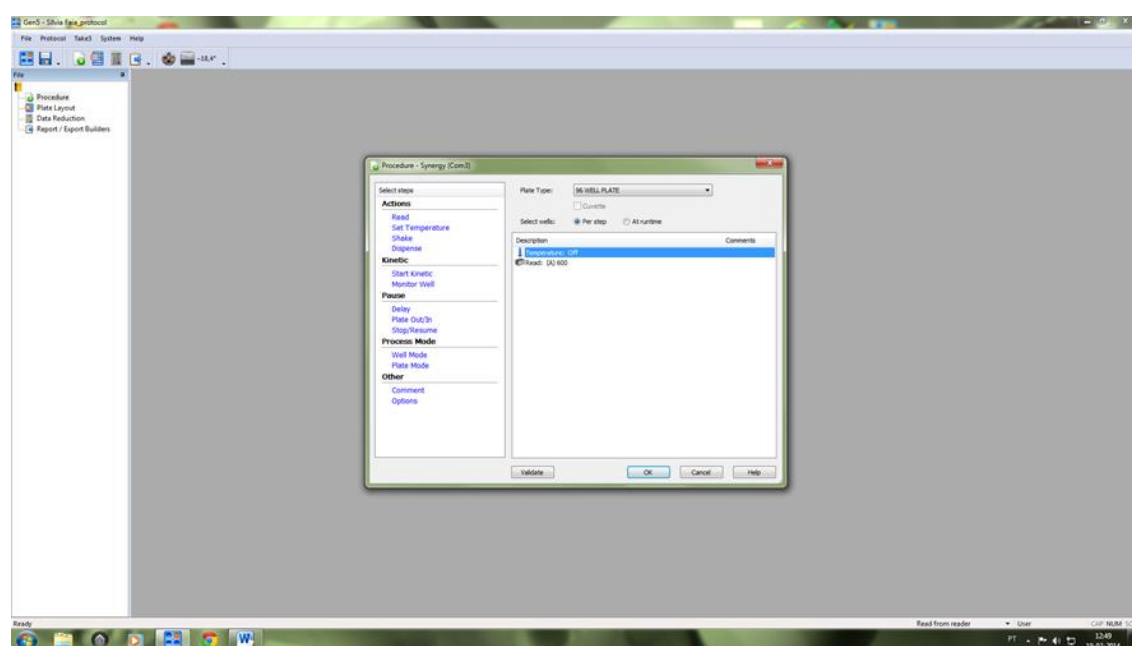
9. Clique em **Set Temperature** e escolha a temperatura de incubação da placa ou selecione **Incubator off** validando com **OK** no caso de não pretender incubar a amostra.



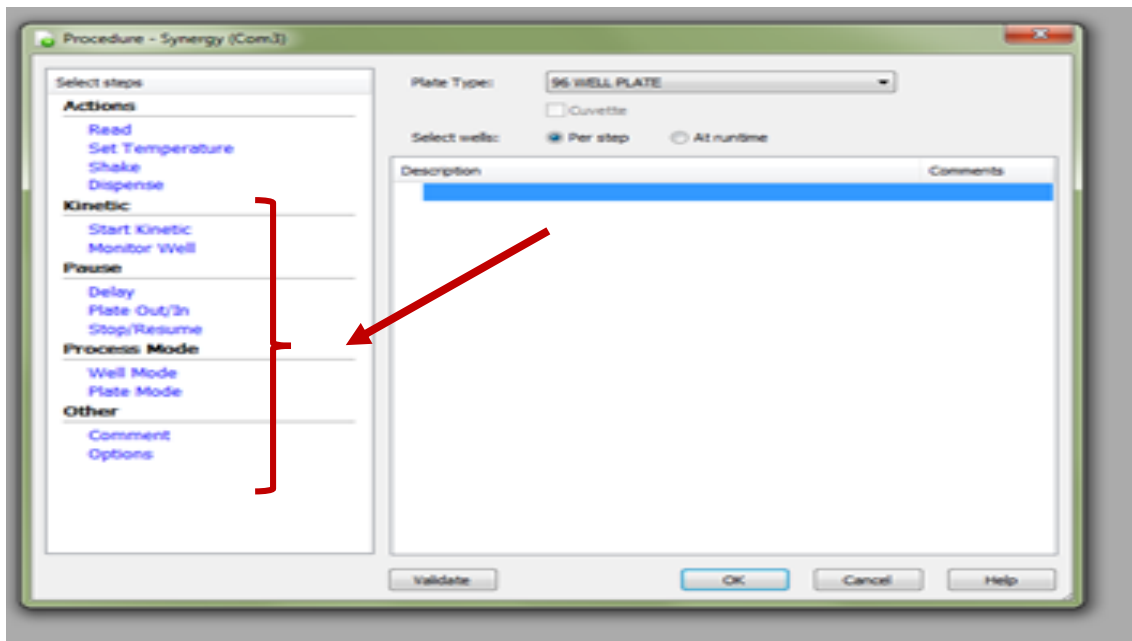
10. Se pretender agitação no menu **Actions** selecione **Shake** e prima **OK**.



11. No ecrã irá visualizar:

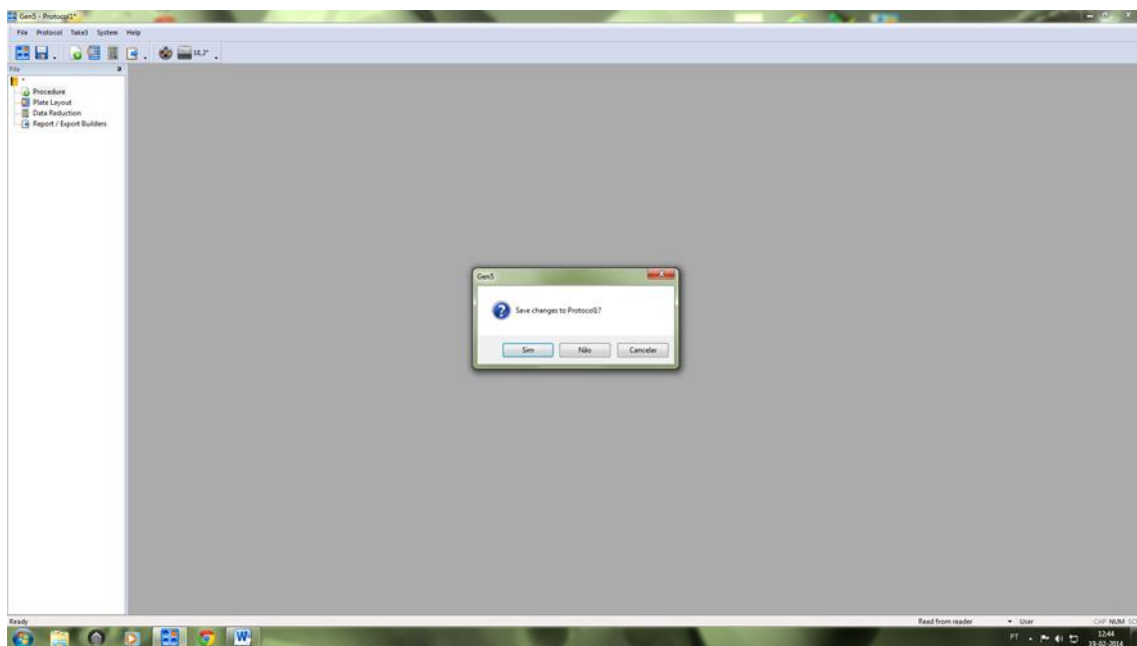


12. Se pretender mais opções para o seu protocolo é só seleccionar dentro do menu **Procedure**.

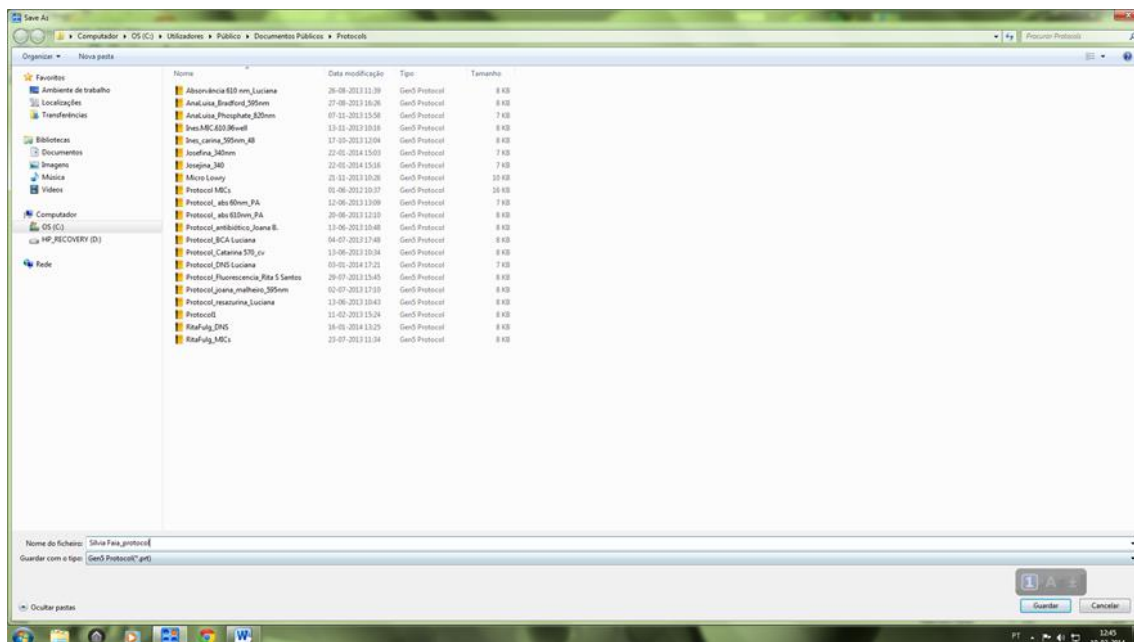


13. Clique em **OK**.

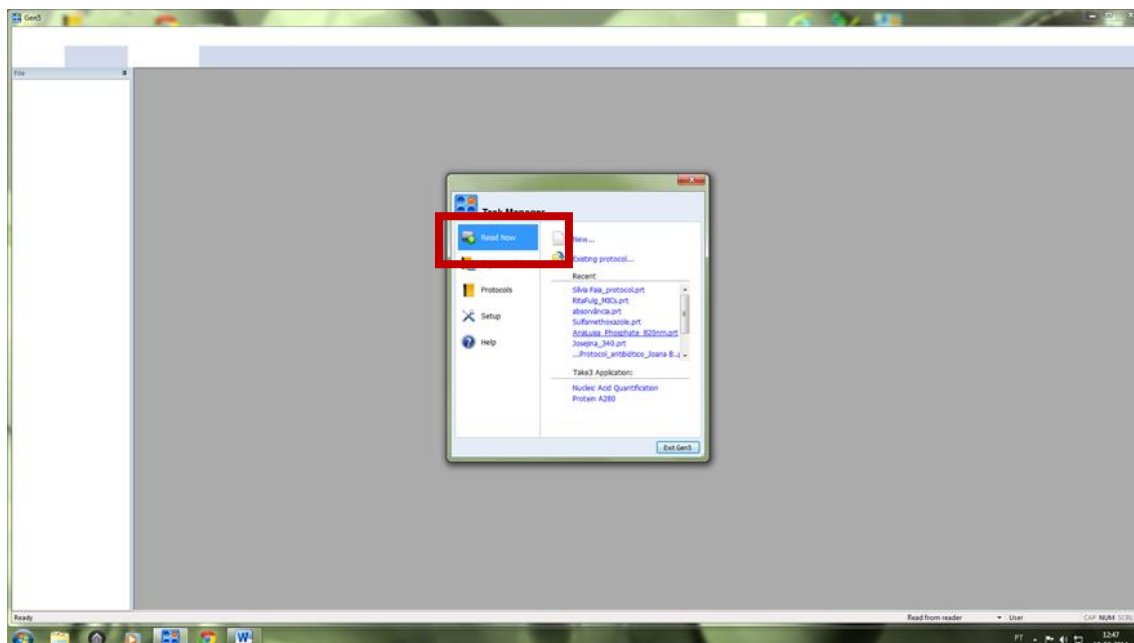
14. No final surgirá uma caixa de texto a perguntar se deseja guardar as alterações efetuadas.



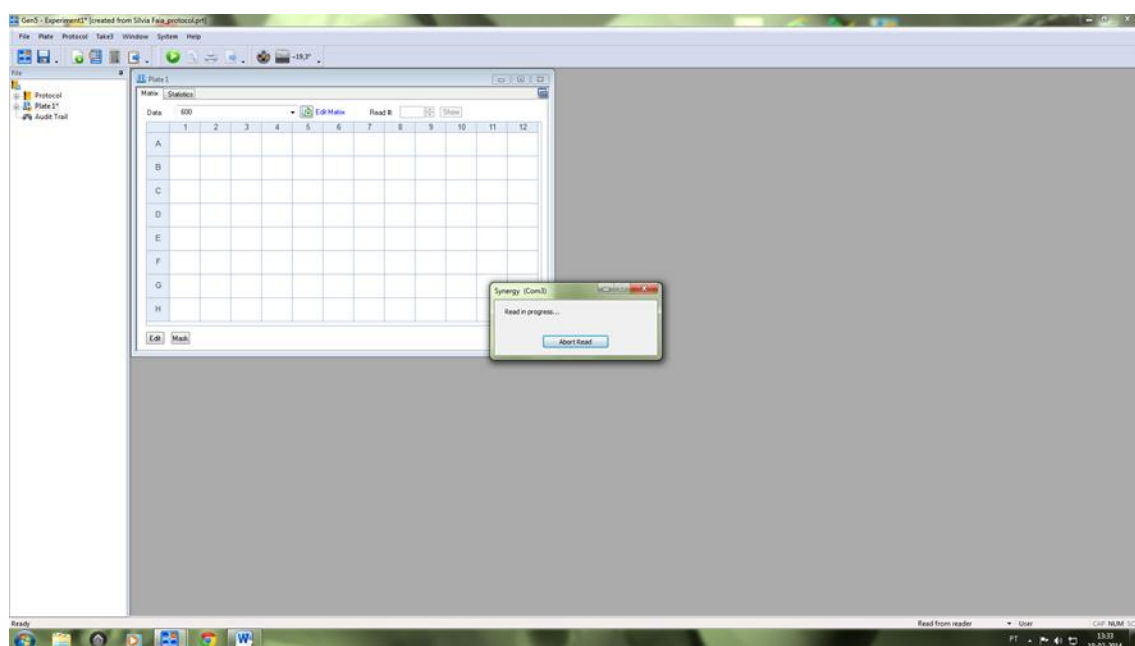
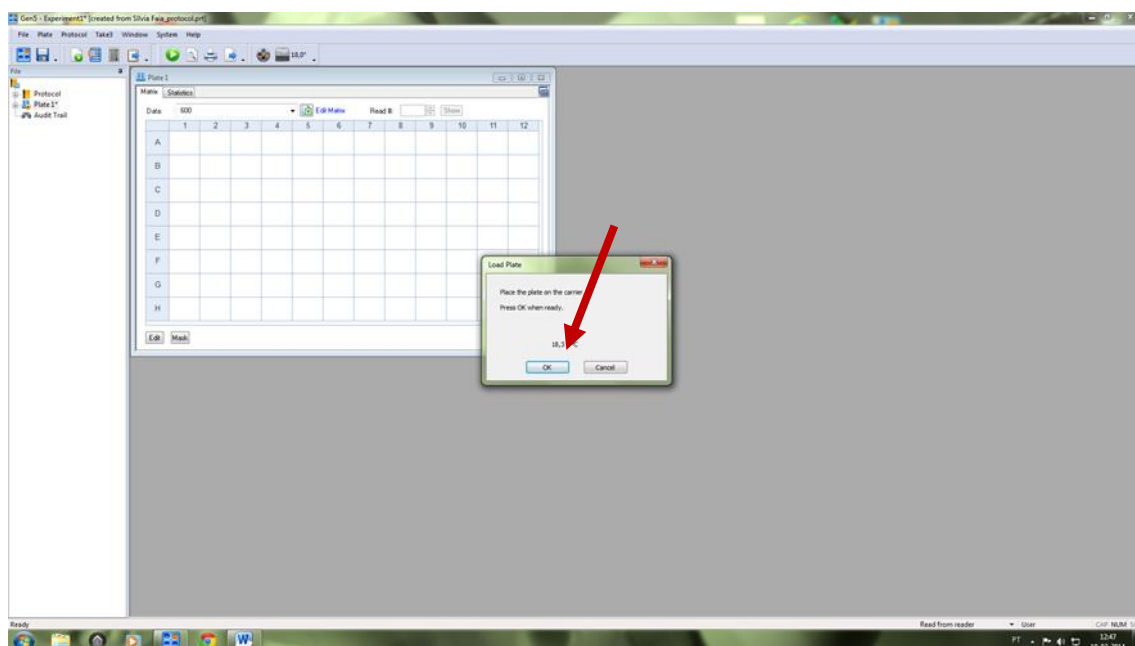
15. Prima **Sim** e dê um nome ao ficheiro.



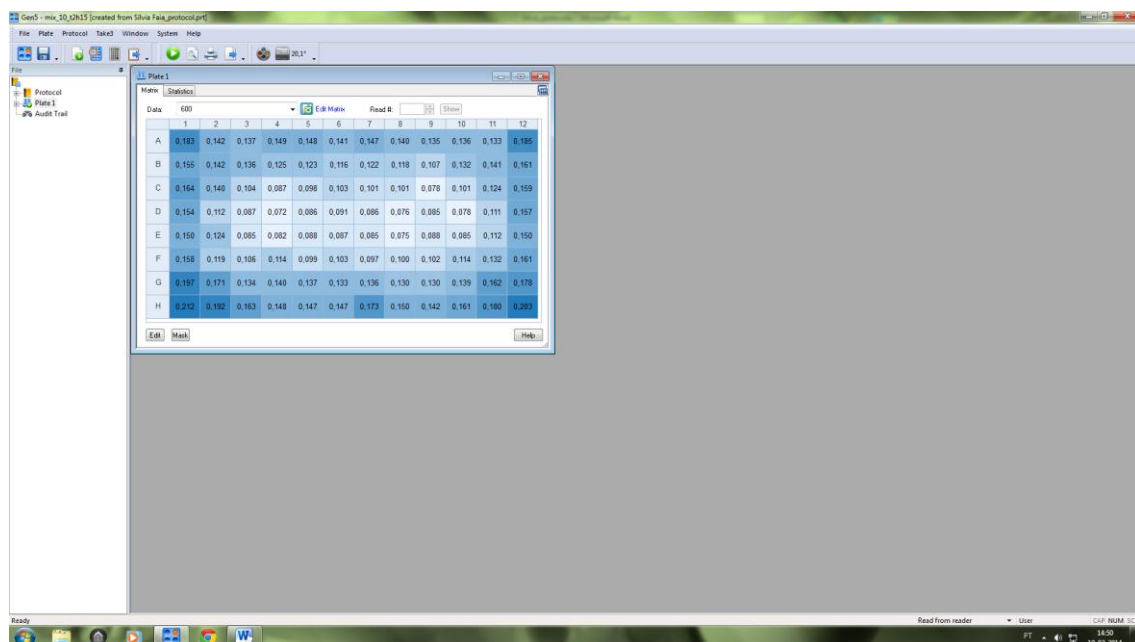
16. Inicie a leitura selecionando **Read Now**:



17. Coloque a placa na cassete e carregue em **OK**.

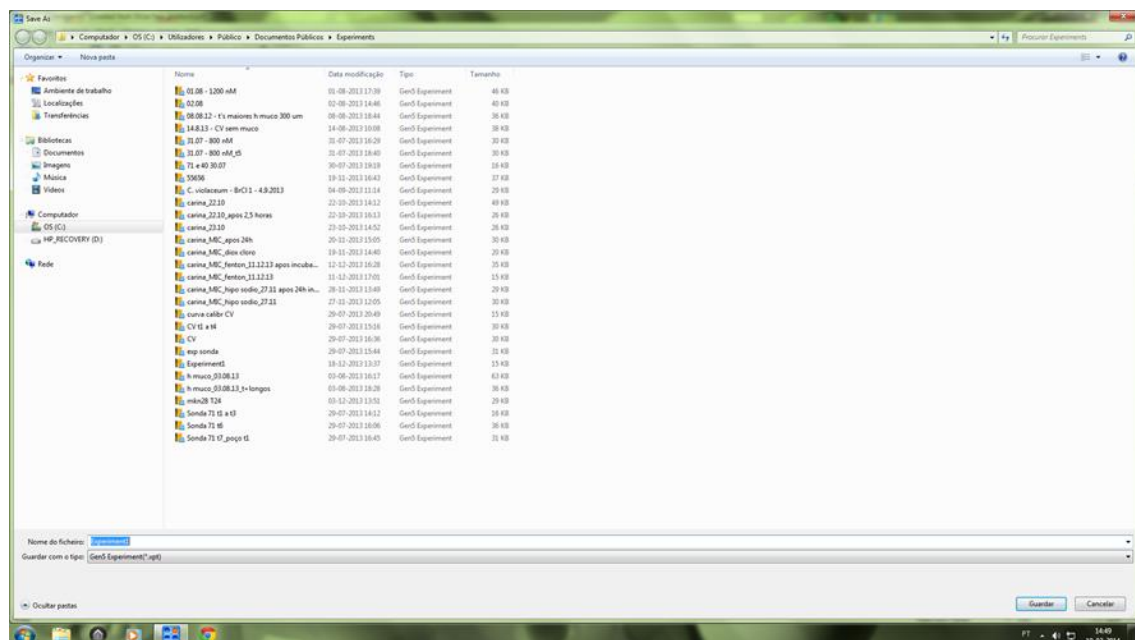


18. Após leitura aparecerá:



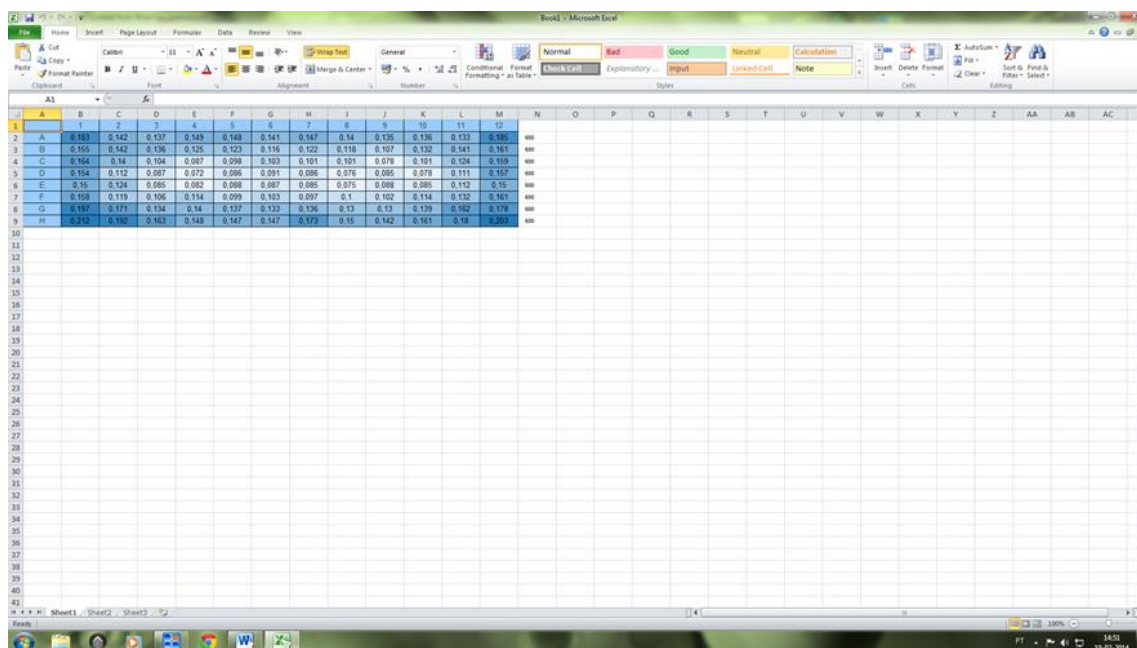
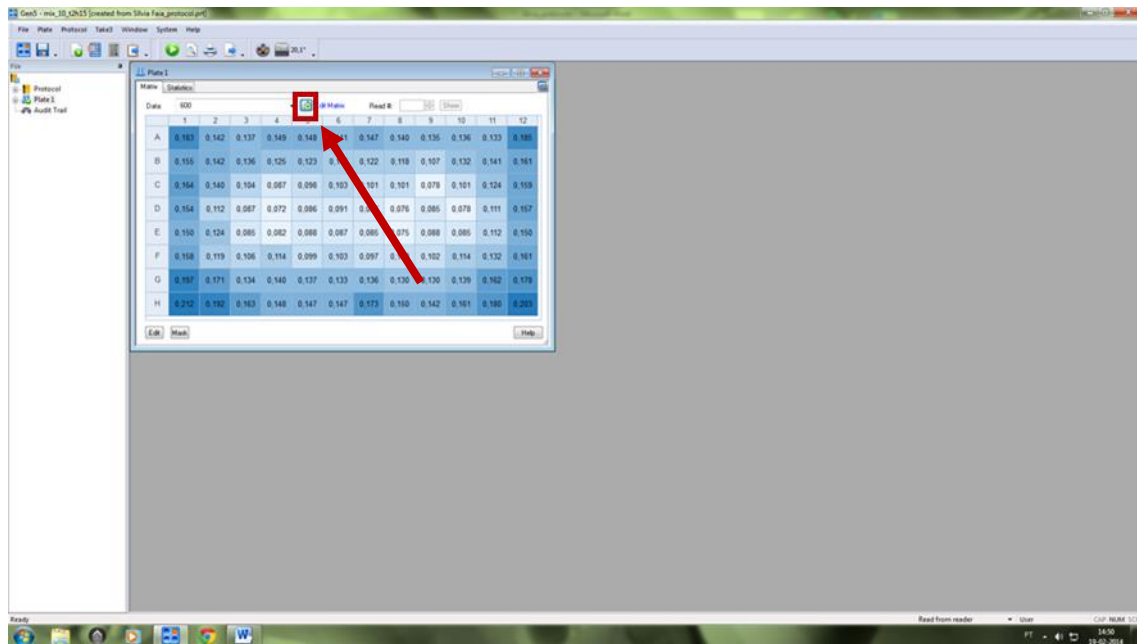
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.103	0.142	0.137	0.149	0.148	0.141	0.147	0.140	0.135	0.136	0.133	0.185
B	0.155	0.142	0.136	0.125	0.123	0.116	0.122	0.118	0.107	0.132	0.141	0.161
C	0.164	0.140	0.104	0.087	0.098	0.103	0.101	0.101	0.078	0.101	0.124	0.159
D	0.154	0.112	0.087	0.072	0.086	0.091	0.086	0.076	0.085	0.078	0.111	0.157
E	0.150	0.124	0.085	0.082	0.088	0.087	0.085	0.075	0.080	0.085	0.112	0.150
F	0.158	0.119	0.106	0.114	0.099	0.103	0.097	0.100	0.102	0.114	0.132	0.161
G	0.197	0.171	0.134	0.140	0.137	0.133	0.136	0.130	0.130	0.139	0.162	0.178
H	0.212	0.192	0.163	0.148	0.147	0.147	0.173	0.160	0.142	0.161	0.180	0.200

19. Grave experiência.

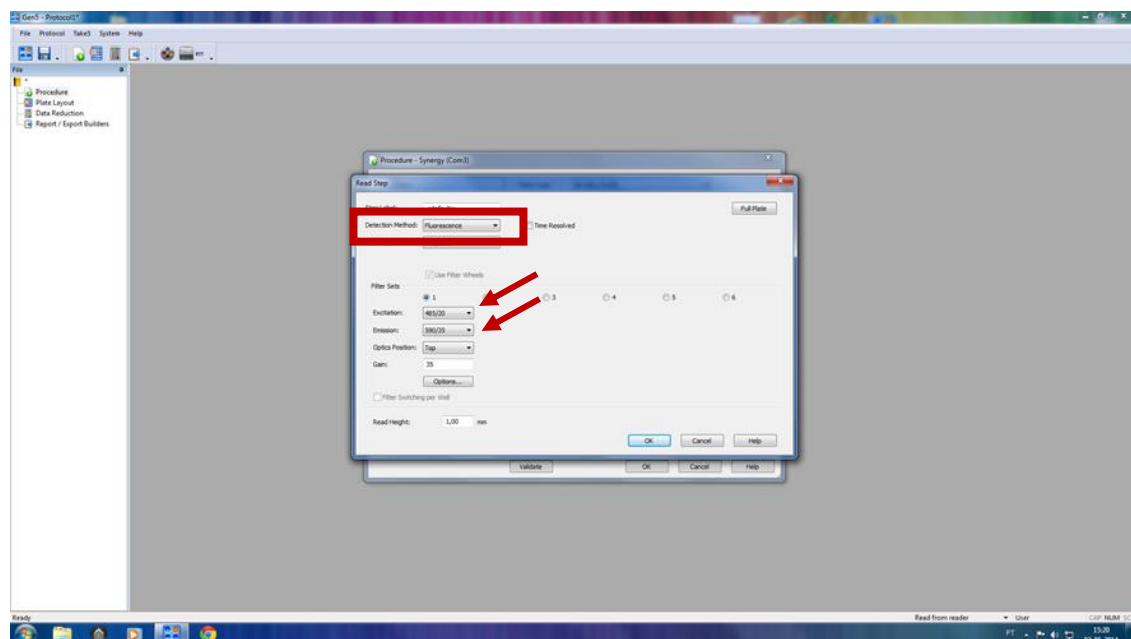


Nome	Data modificação	Tipo	Tamanho
01.08-1.000 mM	01-08-2013 11:39	Gen5 Experiment	40 KB
02.08	02-08-2013 14:46	Gen5 Experiment	40 KB
06.08.12 - 1's maiores h muco 300 um	06-08-2013 14:44	Gen5 Experiment	36 KB
14.8.13 - CV sem muco	14-08-2013 10:08	Gen5 Experiment	38 KB
11.07-800 mM	31-07-2013 14:29	Gen5 Experiment	39 KB
11.07-800 mM_05	31-07-2013 14:40	Gen5 Experiment	39 KB
11.4.40 30.07	30-07-2013 18:18	Gen5 Experiment	38 KB
55436	19-11-2013 16:43	Gen5 Experiment	37 KB
C. violaceum - BrC1 - 4.9.2013	04-09-2013 11:14	Gen5 Experiment	29 KB
carina_22.10	22-10-2013 14:12	Gen5 Experiment	40 KB
carina_23.10, após 2.5 horas	23-10-2013 16:13	Gen5 Experiment	28 KB
carina_23.10	23-10-2013 14:52	Gen5 Experiment	28 KB
carina_3.MC, após 24h	20-11-2013 15:05	Gen5 Experiment	30 KB
carina_3.MC, dois dias	19-11-2013 14:40	Gen5 Experiment	29 KB
carina_3.MC, fentox, 11.12.13 após incub.	11-12-2013 16:28	Gen5 Experiment	30 KB
carina_3.MC, fentox, 11.12.13	11-12-2013 17:01	Gen5 Experiment	35 KB
carina_3.MC, fentox, 27.12 após 24h in.	28-11-2013 13:49	Gen5 Experiment	29 KB
carina_3.MC, fentox, 27.12	27-11-2013 12:05	Gen5 Experiment	30 KB
carina_3.MC, fentox, 27.12	29-07-2013 16:40	Gen5 Experiment	35 KB
CV 0.1 mM	29-07-2013 15:16	Gen5 Experiment	30 KB
CV	29-07-2013 16:36	Gen5 Experiment	30 KB
exp sonda	29-07-2013 15:44	Gen5 Experiment	31 KB
Experiment5	18-12-2013 13:37	Gen5 Experiment	35 KB
h muco_03.08.13	03-08-2013 16:17	Gen5 Experiment	43 KB
h muco_03.08.13, 1+longos	03-08-2013 16:28	Gen5 Experiment	36 KB
mfn28 124	03-12-2013 13:51	Gen5 Experiment	29 KB
Sonda 71 15 a 17	29-07-2013 14:12	Gen5 Experiment	38 KB
Sonda 71 16	29-07-2013 16:06	Gen5 Experiment	38 KB
Sonda 71 17, após 1d	29-07-2013 16:43	Gen5 Experiment	35 KB

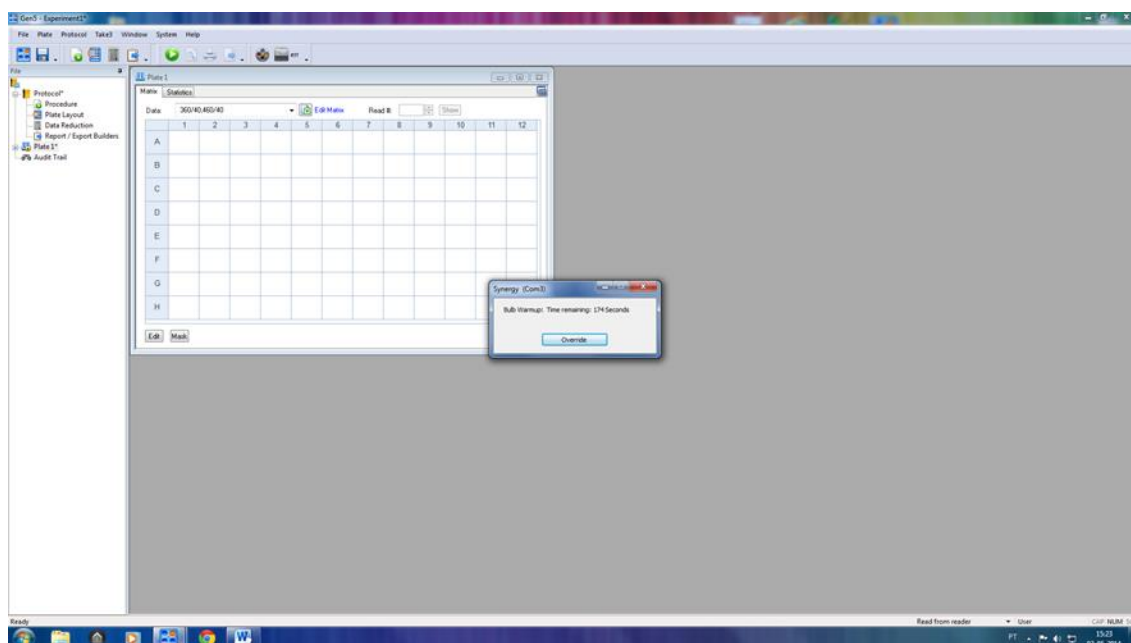
20. Exporte os resultados para excel.



21. Para ler fluorescência selecione **Fluorescence**, escolha os filtros a utilizar em **Excitation** e **Emission** e finalmente clique em **OK**.



22. Aparecerá uma caixa de texto com a indicação que a lâmpada está a aquecer.



23. Continue o procedimento conforme descrito desde o ponto 9.

II. Gráficos de Utilização dos Equipamentos

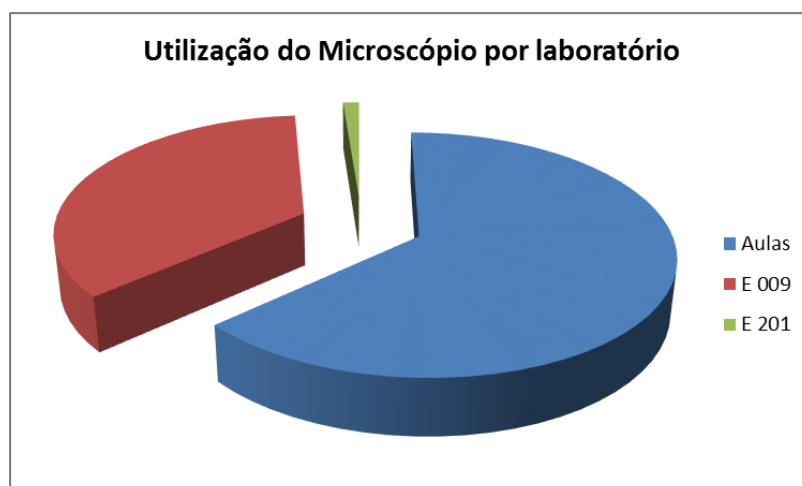


Figura A.16 – Representação gráfica da utilização do microscópio por laboratório.

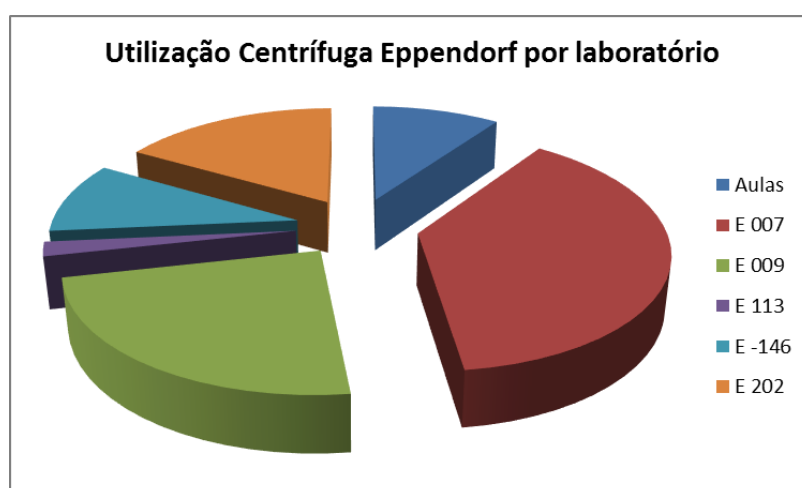


Figura A.17 – Representação gráfica da utilização da centrífuga Eppendorf por laboratório.

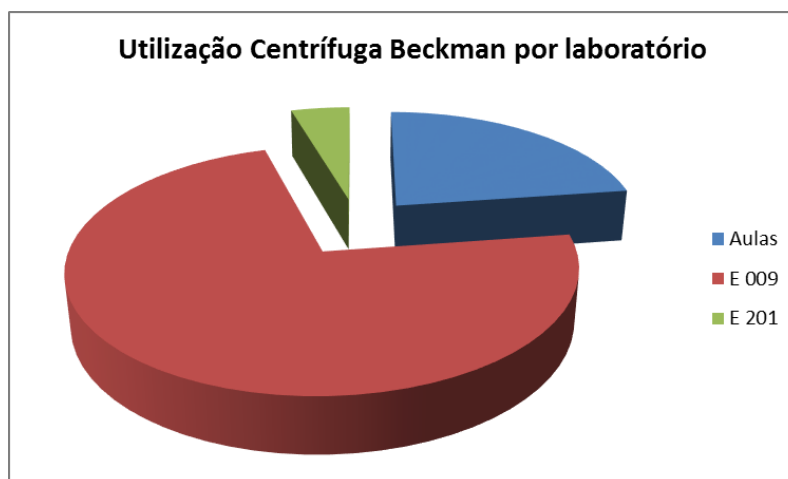


Figura A.18 – Representação gráfica da utilização da centrífuga Beckman por laboratório.

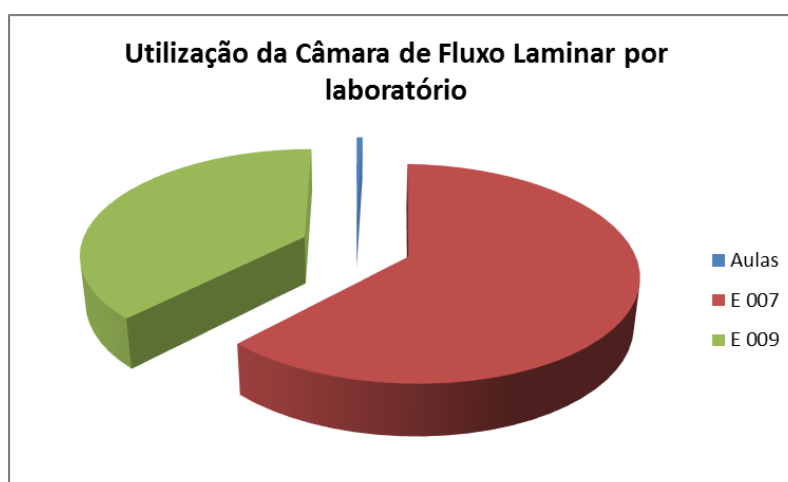


Figura A.19 – Representação gráfica da utilização da câmara de fluxo laminar por laboratório.

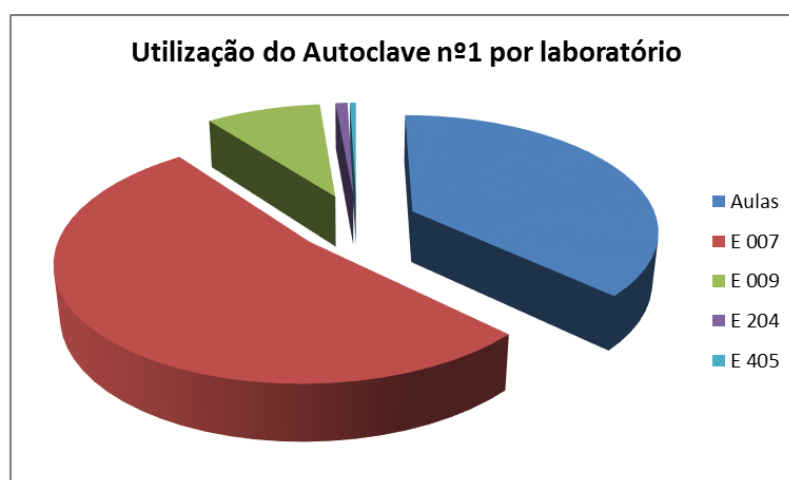


Figura A.20 – Representação gráfica da utilização da autoclave nº1 por laboratório.

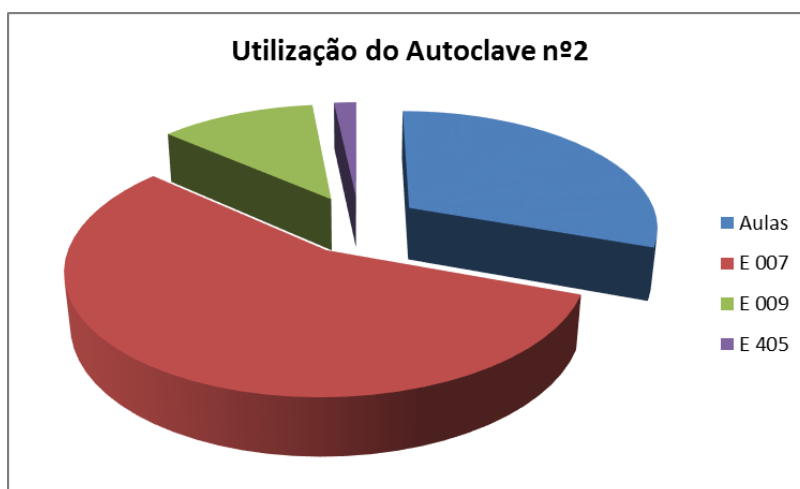


Figura A.21 – Representação gráfica da utilização autoclave nº2 por laboratório.



Figura A.22 – Representação gráfica da utilização do leitor de microplacas por laboratório.

III. Protocolos

III.1. Water quality – detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria (ISO 9308-1)

Procedimento:

1. Filtrar um volume de amostra adequado através da membrana de filtração (0.45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro).
2. Transferir a membrana para uma placa com o meio Lauryl Sulfate Broth.
3. Incubar 4 h a 30 °C + 1 4h a 44 °C.
(O aparecimento de colónias amarelas indica a presença de *E.coli*)
4. Repicar uma colónia para um tubo de ensaio com meio Fluorocult dev Lactose Peptone Broth.
5. Incubar durante 24 h (48 h se necessário) a 35 °C.
(Na presença de *E.coli* o meio passa de roxo a amarelo)
6. Verificar a formação de gás no interior do tubo de fermentação.
(A presença de gás indica teste positivo)
7. Verificar a fluorescência colocando o tubo na câmara de UV a 366 nm. Se não
Se verificar fluorescência ao fim de 24 h de incubação continua-se a incubar até às 48 h.
(A fluorescência indica teste positivo)
8. Fazer o teste do indole adicionando umas gotas de reagente de Kovacs (\pm 5 mm) ao tubo de ensaio e verificar o aparecimento de cor vermelha ao fim de 1 a 2 minutos.
(A presença de cor vermelha indica teste positivo)

Preparação dos meios:

Lauryl Sulfate Broth

Dissolver 76,2 g num litro de água destilada e adicionar 5 g de agar.

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Espalhar em placas.

Fluorocult dev Lactose Peptone Broth

Dissolver 36,1 g num litro de água destilada.

Distribuir em tubos de ensaio contendo tubos de fermentação invertidos.

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

III.2. Water quality – detection and enumeration of intestinal enterococci (ISO 7899-2)

Procedimento:

1. Filtar um volume de amostra adequado através da membrana de filtração (0.45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro).
2. Transferir a membrana para uma placa com o meio Slanetz and Bartley.
3. Incubar a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 h.

(Aparecem colónias vermelhas, castanhas ou rosa)

4. Com ajuda de uma pinça, transferir a membrana para uma placa com meio Bile-aesculin-azid-agar previamente aquecido a 44 °C.

5. Incubar a $44 \pm 0,5$ °C durante 2 h.

(O aparecimento de colónias pretas indica a presença de enterococos).

Preparação dos meios:

Slanetz and Bartley

Dissolver 41,5 g num litro de água destilada aquecendo na panela com água a ferver e deixar 20 minutos para esterelizar.

Espalhar em placas.

Bile aesculin-azid agar

Dissolver 56 g num litro de água destilada.

Adicionar 5 g de agar.

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Espalhar em placas.

III.3. PNA-FISH para identificação de um microrganismo

Após identificação do microrganismo e verificação da existência de concordância entre os dados fenotípicos e os obtidos baseando-se na análise do genótipo, poderão ser desenvolvidas sondas de ácido péptido nucleico (PNA) específicas para identificação *in situ* do microrganismo estudado.

As sondas para PNA-FISH são desenhadas utilizando o programa PRIMROSE, por exemplo, e com base nas sequências de 16S/18S rRNA existentes em bases de dados (ex. http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) pertencentes à espécie do microrganismo em estudo, devendo ter 15 bases de comprimento e uma percentagem de GC entre 50-60%. A avaliação da especificidade e sensibilidade das sondas é feita no site do “Ribosomal Database Project” (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

A sonda escolhida como sendo a melhor mais específica e sensível, será depois usada para identificação do microrganismo em estudo presente numa suspensão, recorrendo à técnica de biologia molecular independente de cultivo, hibridação fluorescente *in situ* (FISH).

A realização desta técnica pode ser dividida em cinco etapas: preparação das amostras, fixação das células, hibridização, lavagem e visualização dos resultados.

Preparação e fixação da amostra

Para a realização desta técnica são usadas lâminas com poços de 8 mm. Para proceder à fixação em lâmina deverá proceder da seguinte forma:

- Preparar um inóculo em salina estéril do microrganismo que se pretende usar. Este inóculo não deve ficar turvo ($DO \approx 0.1$). Se necessário dilui-lo um pouco (poderá ter de ser um pouco mais turvo no caso da *S. cerevisiae*);
- Em duplicado, colocar 20 μL do inóculo anterior em um dos poços da lâmina. Secar o líquido à chama. Uma lâmina será posteriormente usada como controlo negativo;
- Cobrir a superfície da amostra com 30 μL de solução de paraformaldeído 4% (vol/vol) e deixar repousar durante 10 minutos. Verter o paraformaldeído que possivelmente esteja em excesso;
- Colocar etanol a 50% (vol/vol) de modo a cobrir a superfície da amostra (aproximadamente 30 μL) e deixar novamente repousar durante 10 minutos. Verter o etanol que possivelmente esteja em excesso;
- Colocar as lâminas em caixas de Petri;
- Guardar as lâminas a 4 °C até à sua posterior utilização.

Hibridação e lavagem

Nota: Uma vez que a sonda possui um fluorocromo que é fotossensível deverá reduzir-se ao máximo a iluminação no laboratório, e envolver com papel de alumínio todos os materiais onde a sonda seja colocada.

- Preparar a solução de hibridação (alíquota de uso). Num eppendorf envolvido em papel de alumínio e devidamente identificado, acrescentar 1 μL da sonda stock respetiva (4 μM) a 19 μL solução de hibridação.

Nota: A sonda é fornecida na aula não sendo necessário qualquer tipo de manipulação da mesma.

- Adicionar 20 µL da alíquota de uso (200 mM). Nos controles negativos adicionar 20 µL de solução de hibridação sem sonda. Cobrir com lamelas;
- Colocar as lâminas nas caixas de Petri envoltas em papel de alumínio para ficarem ao abrigo da luz;
- Incubar as lâminas durante 1 h à temperatura de 58 °C;
- Encher um “coplin jar” com solução de lavagem e colocar na estufa junto com as lâminas para pré-aquecer;
- Retirar as lâminas das caixas de Petri, remover as lamelas e mergulhar as lâminas dos controles negativos num “coplin jar” diferente das lâminas contendo solução de hibridação e sonda na solução de lavagem e deixar na estufa durante mais 25 minutos.

Visualização dos resultados

- Retirar as lâminas dos “coplin jar” e deixar secar ao ar, no escuro,
- Colocar óleo de imersão e observar ao microscópio de epifluorescência.

A microscopia de epifluorescência baseia-se no uso de luz num comprimento de onda apropriado para estimular a fluorescência numa amostra. No caso do método de PNA-FISH, o comprimento de onda usado será aquele que estimulará o fluorocromo acoplado à sonda PNA usada. Assim sendo, os filtros a utilizar deverão ter em conta esse comprimento de onda.

Anexos ao protocolo

1. Preparação da solução de fixação

Solução de Paraformaldeído 4%

A preparação de 100 mL de solução de paraformaldeído deverá efetuar-se da seguinte forma:

- Aquecer 65 mL de água destilada a 60 °C e adicionar, na hotte, 4,0 g de paraformaldeído;
- Manter a solução na placa térmica sob agitação e adicionar, gota a gota, NaOH (2 M) para clarificar a solução que se encontra esbranquiçada (deve demorar 1 a 2 min);
- Retirar da fonte de calor e adicionar 33 mL de 3xPBS (Phosphate Buffered Saline);
- Ajustar o pH a 7,2 com HCl (1 M);
- Filtrar a solução através de um acrodisco de porosidade 0,2 µm (Orange Scientific);
- Arrefecer rapidamente até aos 4 °C, no frigorífico ou com gelo.

Solução 3xPBS

A tabela que se segue contém as quantidades de reagentes necessárias à preparação de 200 mL de solução 3xPBS utilizada na preparação da solução de paraformaldeído 4%.

Tabela 1 – Composição da Solução 3xPBS

Compostos e concentração na solução	Quantidade (g)
180 mM Cloreto de Sódio	4,8
3 mM Cloreto de Potássio	0,120
9 mM Fosfato de Sódio Dibásico	0,486
1,5 mM Hidrogenofosfato de Potássio	0,120

Após a dissolução de todos os reagentes, perfazer o volume final com água destilada e autoclavar a solução (121 °C, 15 minutos).

2. Preparação da solução de hibridização

A quantidade de reagentes necessários para preparar 10 mL de solução vem apresentada na tabela 2.

Tabela 2 – Composição da solução de hibridização

Compostos e concentração na solução	Quantidade
10% (m/vol) Sulfato de Dextrano	1 g
10 mM Cloreto de Sódio	0,0058 g
30% (vol/vol) Formamida	3 mL
0,1% (m/vol) Pirofosfato de Sódio	0,01 g
0,2% (m/vol) Polivinilpirrolidona	0,02 g
0,2% (m/vol) Ficoll	0,02 g
5 mM Di-sódio EDTA	0,02 g
0,1% (vol/vol) Triton X-100	0,01 mL
50 mM Tris-HCl	0,079 g

Após a dissolução de todos os reagentes, perfazer o volume final com água e acertar a pH 7,5 (ajuda a dissolver o sulfato de dextrano). Filtrar a solução com acrodisco de porosidade 0,2 µm. Guardar a solução a 4 °C.

3. Preparação da solução de lavagem

Na tabela 3 vem descritas as quantidades de reagentes necessárias à preparação de 500 mL de solução de lavagem. Como a solução perde rapidamente as suas propriedades tem uma validade de 1 a 2 semanas.

Tabela 3 – Composição da solução de lavagem

Compostos e concentração na solução	Quantidade
5 mM Tris Base	0,303 g
15 mM Cloreto de Sódio	0,438 g
1% (V/V) Triton-X	0,5 mL

Após a dissolução de todos os reagentes, perfazer o volume com água destilada e acertar o pH a 10. Autoclavar a solução (121 °C, 15 minutos) e guardar a 4 °C.

III.4. Caracterização físico-química e reológica de iogurtes

1. Introdução

O iogurte é um produto lácteo, fresco, obtido pela ação fermentativa de culturas bacterianas que consistem tipicamente numa mistura de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que coexistem simbioticamente.

Geralmente, o iogurte é produzido a partir de leite pré aquecido. O teor em gordura varia de acordo com a região do mundo e com a legislação do país de produção e comercialização. O iogurte pode ser produzido na forma simples, ou com adição de frutas, açúcar, cereais, ou outros aditivos, como corantes ou agentes espessantes. Diferentes tipos de leite podem ser utilizados para produzir iogurte. Esta variação do leite utilizado tende a afetar as características finais do produto em termos de textura, aroma e sabor.

O iogurte caracteriza-se por:

- Conter menor teor de lactose que o leite. A lactose é parcialmente transformada em ácido láctico durante a fermentação, sendo esta transformação essencial para que os indivíduos intolerantes à lactose possam consumir produtos lácteos.
- Ser um alimento rico em proteínas, contribuindo para o crescimento normal e manutenção da massa muscular.
- Conter cálcio mineral, existente no leite e essencial para o fortalecimento dos dentes e ossos.

O iogurte possui uma textura que o diferencia de outros produtos derivados do leite. A sua textura e viscosidade são uns dos principais fatores envolvidos na qualidade e na aceitação do produto. A estrutura física do iogurte funciona como uma rede de partículas de caseína agregadas, onde o soro, os glóbulos de gordura e as bactérias lácticas estão aprisionados.

Os métodos de produção de iogurte e as formulações utilizadas variam significativamente com o país produtor e com a marca, resultando em produtos com propriedades organoléticas diferentes.

O objetivo do trabalho é avaliar as características físico-químicas e reológicas de três iogurtes: um iogurte sólido, um iogurte batido e um iogurte líquido.

O procedimento experimental apresentado pretende fornecer alguns dados para o arranque do trabalho.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Potenciômetro	Balança
Iogurtes	Varetas de vidro
Espectrofotômetro	Viscosímetro “Visco Star Plus”
Estufa a 103-105 °C	Bureta
Banho a 80 °C	Balança
Matrizes 100 mL	Micropipeta de 5 mL
Suporte de buretas	Pontas de 5 mL
Cadinhos	Cuvettes
Espátula	Tubos de ensaio

2.2 Reagentes

NaOH	Reagente de Bradford
Fenolftaleína	Reagente de DNS

2.3 Procedimento Experimental

pH

Determinar o pH, medindo diretamente nos copos de iogurte com um potenciômetro digital.

Viscosidade

Antes de abrir a embalagem, o iogurte deverá ser homogeneizado manualmente 10 vezes, 5 vezes ou 2 vezes, caso seja iogurte sólido, iogurte batido ou iogurte líquido, respectivamente.

No caso do iogurte líquido, é necessário vertê-lo para um gobelê de 150 mL para ser possível introduzir o *spindle* no mesmo.

De seguida, os iogurtes deverão ser deixados a repousar no frio, a 4 °C (no mínimo 10 minutos), para estabilizar a estrutura. A temperatura é um parâmetro que influencia a viscosidade. Consequentemente, os iogurtes deverão ser mantidos a 4 °C até iniciar o ensaio.

Após este período de tempo, deverá medir a viscosidade do iogurte.

Para a utilização do viscosímetro deverá seguir os seguintes passos:

Primeiro, ligar o aparelho (Figura A.16) nos dois botões situados na parte detrás do equipamento.



Figura A.23 Viscosímetro VISCO STAR PLUS.

De seguida irá aparecer um menu igual à imagem seguinte.

→Config. de Medida
Memorias
Auto-Teste
Configuracao

Escolher a primeira opção e pressionar ENTER, originando o menu abaixo.

Saida	
→Arquivo	Nao
Plotter	Nao

Pressionar a tecla ON, aparecendo o seguinte menu:

→Measurement
Time to stop
Time to torque

Utilizar as setas para escolher a opção **Time to stop** e pressionar ENTER, aparecendo o menu abaixo:

Time 00h 00m 00s

Deverá ser pressionada a função ENTER no local onde se deseja alterar e carregar nas setas para aumentar ou diminuir o valor. A tecla TAB pode ser utilizada para o cursor ser deslocado para o lado. Deve ser escolhido o tempo desejado (15 minutos), mais 1 minuto para a estabilização do sistema.

No final desta seleção deverá pressionar ON e aparecerá o menu:

Medição

SP: L1 RPM:100.0

d: 1.0000 g/cm³

-----63.6

O SP representa o *spindle* selecionado e deve-se escolher o *spindle* de acordo com a Tabela 1. A escolha do *spindle* está relacionada com o valor da viscosidade e a percentagem de erro deverá estar entre 15 e 85% para se obterem valores credíveis.

Tabela 1 – *Spindle* utilizada para cada iogurte

Iogurte	<i>Spindle</i>
Batido de morango (polpa) MIMOSA	PC
Aroma de morango MIMOSA	PC
Líquido de morango MIMOSA	L1

No valor de rpm escolher 3 para realizar o teste.

Quando estiver tudo selecionado e a amostra colocada corretamente por baixo do *spindle*, pressionar ON e o teste será iniciado. Para cancelar a operação carregar em QUIT.

ATENÇÃO: O *spindle* deverá ser colocado centralmente no copo.

Acidez

A acidez é determinada através de uma titulação. A titulação é efetuada com a solução de NaOH 0.10 M (titulante) e fenolftaleína (indicador). O titulado deve ser

diluído na proporção de 1 para 10 mL. A titulação deve ser efetuada até ao aparecimento de cor rosa.

A acidez pode ser calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Acidez (g/L)} = \frac{S \times N \times 40}{V}$$

Para além da percentagem de acidez total, também se pode determinar a percentagem de acidez em ácido láctico utilizando a equação seguinte:

$$\% \text{ Acidez ácido láctico (g/mol)} = \frac{S \times 90.08}{V}$$

Em que:

S – volume de NaOH (mL)

N – normalidade de NaOH (mol/L)

40 – massa molecular de NaOH (g/mol)

V – volume de amostra (mL)

90.08 – massa molecular do ácido láctico (g/mol)

Sólidos totais

Para a determinação dos sólidos totais, a amostra deverá ser colocada num cadinho previamente pesado, após ter sido colocado numa estufa a 103 - 105 °C, durante 2 horas. Adicionar cerca de 10 gramas de iogurte no cadinho e colocar na estufa a 105 °C durante 24 horas ou até atingir peso constante. Tirar o cadinho + amostra para um exsiccador e pesar, quando atingir a temperatura ambiente.

Proteínas

Deverá começar por diluir os iogurtes na proporção 1:10.

Pipetar 100 µL de cada uma das amostras diluídas para um tubo de ensaio. Seguidamente, adicionar 5 mL de reagente de Bradford. Agitar no vórtex e aguardar 20 minutos. No final, ler a absorvância (595 nm) das amostras com um branco de água destilada.

A concentração de proteínas pode ser calculada pela equação seguinte:

$$\text{Abs}_{595\text{ nm}} = (-0,0097 \pm 0,0306) + (1,1418 \pm 0,0532) \times [\text{proteína (g/L)}]$$

Açúcares redutores

A cada 0.5 mL de amostra previamente diluída, adicionar 0.5 mL de DNS em tubos de ensaio. O branco deve ser preparado da mesma forma usando água destilada. Mergulhar os tubos num banho a 80 °C, durante 5 minutos. De seguida arrefecer os tubos num banho à temperatura ambiente e adicionar 5 mL de água destilada. Ler a absorvância a 540 nm.

ATENÇÃO: Os iogurtes deverão ser diluídos na proporção 1:100.

Utilizando a equação apresentada, calcule a concentração dos açúcares redutores:

$$\begin{aligned}\text{Abs}_{540\text{ nm}} = & (5,28 \times 10^{-4} \pm 4,2 \times 10^{-5}) \times [\text{glucose (mg/L)}] \\ & + (-1,45 \times 10^{-3} \pm 2,567 \times 10^{-2})\end{aligned}$$

3. Tratamento de resultados

Apresente as curvas da viscosidade ao longo do tempo para os três tipos de iogurte. Analise os resultados obtidos para o pH, acidez, sólidos totais, concentração de açúcares redutores e proteínas, comparando os diferentes tipos de iogurtes utilizados. Apresente outros resultados obtidos que sejam relevantes.

4. Referências

- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Milk and Dairy Products*, in Food Chemistry, cap. 10, 4ª edição, Springer, Alemanha, 2009.
- Boylston, T. D., *Dairy Products*, in Food Biochemistry and Food Processing, edited by Hui, Y. H., cap. 26, 1ª edição, Iowa, EUA, Blackwell Publishing, 2006
- Hutkins, R. W., *Cultured Dairy Products*, in Microbiology and Technology of Fermented Foods, cap. 4, 1ª edição, IFT Press & Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, 2006.

- Jaros, D., Rohm, H., *Controlling the texture of fermented dairy products: the case of yoghurt*, in Dairy processing: Improving quality, edited by Smit, G., cap. 8, 1ª edição, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido, 2003.
- Nauth, K. R., *Yogurt*, in Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology, edited by Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P. S., parte II, cap. 7, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, EUA, 2004.
- Shima, A. R. R., Salina, H. F., Masniza, M., Atiqah, A. H., *Viability of Lactic Acid Bacteria in Home Made Yogurt Containing Sago Starch Oligosaccharides*, International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS, 12:1, 58-62, 2012.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J., *Fermented Milks*, in Dairy Science and Technology, part III, cap.22, 2ª edição, Taylor & Francis Group, LLC, Londres, Reino Unido, 2006.

III.5. Secagem de maçã

1. Introdução

O processo de secagem permite a eliminação da água (ou outro líquido) de um material sólido, de forma a reduzir a quantidade de água residual. Esta redução de água é pretendida a nível industrial por diversos motivos, como a redução dos custos de transporte, a otimização da conservação e armazenamento dos produtos, de forma a atingir um produto final com uma determinada qualidade (de Azevedo e Alves, 2010).

A conservação melhorada dos alimentos, deve-se ao facto de, no processo de secagem, o teor de água ser reduzido, o que leva a uma diminuição da atividade dos microrganismos e das enzimas que degradam os alimentos, bem como a uma redução da degradação química (Martinazzo *et al.*, 2007).

Por estes motivos, os materiais sólidos requerem muitas vezes processos de secagem na sua produção, sendo por este motivo, a secagem, um processo essencial na indústria alimentar, química, farmacêutica, etc. (de Azevedo e Alves, 2010).

A secagem de materiais sólidos é um processo complexo, pois envolve a interação gás-líquido controlada por fenómenos de transferência de calor e de massa. Quando o produto é colocado em contacto com o ar quente, a diferença de temperaturas origina uma transferência de calor entre o ar e o produto. Por outro lado, a diferença de pressão de

vapor entre o ar quente e a superfície do produto provoca a libertação de vapor de água, gerando a transferência de massa (de Gouveia *et al.*, 2003).

Estes processos ocorrem em simultâneo com processos cinéticos associados a alterações físicas e químicas que podem originar alterações de cor, textura, odor, entre outras, no material sólido. Deste modo, muitas vezes associado a este processo encontra-se a aplicação de tratamentos nos produtos para que estes não sofram alterações das propriedades organoléticas (de Azevedo e Alves, 2010).

A estrutura, a forma e dimensão dos diversos produtos, o tipo de secadores empregues, a temperatura e a velocidade do ar têm influência no processo de secagem (de Gouveia *et al.*, 2003).

Os secadores aplicados podem operar em contínuo ou descontínuo, e a energia pode ser transferida por convecção ou por condução. Na secagem por convecção (ou direta) o sólido é exposto, diretamente, a uma corrente de ar quente, recebendo calor por convecção. Na secagem por condução (indireta), o sólido é colocado numa superfície metálica aquecida, através da qual o calor é transferido (de Azevedo e Alves, 2010).

De forma a avaliar o processo de secagem, encontram-se descritos modelos matemáticos, baseados em processos de simulação (Pontes *et al.*, 2009).

Foram desenvolvidos diversos tipos de modelos: modelos teóricos, empíricos e semi-teóricos (Martinazzo *et al.*, 2007).

Dentro dos modelos teóricos, prevalece a difusão baseada segundo a Lei de Fick, na qual é descrito que o gradiente de concentração de água é proporcional ao fluxo de massa, por unidade de área (Martinazzo *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2009).

Relativamente aos modelos empíricos, estes são realizados segundo dados experimentais. Nestes modelos é exposta a proporcionalidade direta entre o teor de humidade e o tempo de secagem. Dentro deste modelo, o mais aplicado é o de Thompson (Martinazzo *et al.*, 2007).

No que concerne aos modelos semi-teóricos, estes são a combinação dos modelos anteriores, baseando-se na Lei de Newton. Esta Lei assume que as condições aplicadas são isotérmicas e que as resistências à transferência de massa são maioritariamente na superfície do produto. Os modelos de Page, Page modificado, Dois Termos, Henderson e Pabis são os modelos mais comumente aplicados (Martinazzo *et al.*, 2007).

Os diferentes modelos ajustam-se a situações diferentes de secagem, conforme o produto utilizado e as condições empregues (Martinazzo *et al.*, 2007).

Na Tabela 1 encontram-se as equações matemáticas descritivas destes modelos.

Tabela 1 – Modelos matemáticos para avaliar o processo de secagem

Modelo	Equação	Referência
De difusão (Lei de Fick)	$RU = \frac{U - U_e}{U_i - U_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{-(2n+1)^2 \pi^2 D \frac{t}{4L^2}}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007; Pontes <i>et al.</i> , 2009
Thompson	$t = a \cdot \ln(RU) + b \cdot [\ln(RU)]^2$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007
Newton	$RU = e^{(-k \cdot t)}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007
Page	$RU = e^{(-k \cdot t^n)}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007; Pontes <i>et al.</i> , 2009
Page modificado	$RU = e^{[-k \cdot t^n]}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007; Pontes <i>et al.</i> , 2009
Dois Termos	$RU = a \cdot e^{(-k_0 \cdot t)} + b \cdot e^{(-k_1 \cdot t)}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007
Henderson e Pabis	$RU = a \cdot e^{(-k \cdot t)}$	Martinazzo <i>et al.</i> , 2007

Em que (Martinazzo *et al.*, 2007; Pontes *et al.*, 2009):

RU – razão de humidade do produto (adimensional)

t – tempo de secagem (s)

k, k₀, k₁ – coeficientes de secagem (s⁻¹)

a, b, n – constantes dos modelos (adimensional)

n – número de termos da equação (adimensional)

D – coeficiente de difusão (m²s⁻¹)

L – espessura do produto (m)

U – teor de água do produto

U_i – teor de água inicial do produto

U_e – teor de água de equilíbrio do produto

O processo de secagem possui vantagens e desvantagens (de Azevedo e Alves, 2010).

As principais vantagens são (de Azevedo e Alves, 2010):

- Facilidade do processo.
- Custo e simplicidade do equipamento.
- Aumento do período de vida útil.

As desvantagens são (de Azevedo e Alves, 2010):

- Alteração das propriedades físicas e químicas das amostras;

O objetivo deste trabalho experimental consiste na determinação das curvas de secagem para a maçã.

O procedimento experimental apresentado pretende fornecer alguns dados para o arranque do trabalho. O teste de outras condições processuais deverá ser planeado pelo grupo diretor.

2. Procedimento experimental

2.1 Material

Estufa a 60 °C

Exsicador

Balança

Placas de Petri

Maçãs

2.2 Reagentes

Cloreto de sódio 0.5%

Cloreto de sódio 1%

Ácido ascórbico 1%

2.3 Procedimento

Descascar as maçãs e cortar fatias de aproximadamente 5 mm e com o mesmo tamanho (o mais aproximadamente possível). Deverá cortar em número suficiente para

elaborar a curva de secagem (processo a decorrer durante 48 horas), de forma a possuir quadruplicados e para amostras sem tratamento e com tratamento (descrito abaixo).

Adicionalmente cortar mais fatias de maçã para determinação dos pesos secos, após pesagem prévia. Para obter o peso seco, colocar as amostras na estufa a 60 °C até atingir peso constante, e pesar, depois de deixar arrefecer no exsiccador.

Para a determinação do teor de humidade crítico, colocar quatro amostras, previamente pesadas, após 48 horas de secagem, à temperatura ambiente até atingir peso constante.

Nota: todos os recipientes (vazios, ou com amostra) devem ser rigorosamente pesados antes e após secagem.

Colocar as amostras nas prateleiras da estufa a 60 °C (estas amostras devem ser rigorosamente pesadas – tempo zero). Ao longo dos tempos definidos pelo grupo diretor devem ser retiradas amostras (sempre em duplicado) e colocadas no exsiccador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, pode-se efetuar a pesagem rigorosa.

Adicionalmente devem ser testados dois métodos de conservação da maçã, através da utilização de NaCl a 1% e ácido ascórbico a 1%.

Para este fim, colocar as amostras numa solução de NaCl a 0.5% durante 5 minutos (pré-tratamento).

No final deste tempo, dividir as maçãs pelos outros tratamentos (NaCl a 1% e ácido ascórbico a 1%). Esperar mais 5 minutos.

Retirar as fatias dos tratamentos, remover o excesso de solução com papel absorvente antes de colocar nos recipientes.

Proceder com o processo de secagem, da mesma forma que anteriormente.

Não esquecer de cortar fatias adicionais para a determinação do peso seco e de determinar o teor de humidade crítico após 48 horas de secagem, para as amostras com tratamento.

3. Tratamento dos resultados

Elaborar as curvas de secagem (humidade em função do tempo) e determinar o teor de humidade crítico. Analisar a influência dos diversos processos de conservação na secagem da fruta. Apresentar outros resultados obtidos que sejam relevantes.

4. Referências

- de Azevedo, E. G., Alves, A. M., *Engenharia de Processos de Separação*, cap. 12, Instituto Superior Técnico, 2010.
- de Gouveia, J. P. G., Almeida, F. A. C., Farias, E. S., da Silva, M. M., Chaves, M. C. V., L. S., Reis, *Determinação das Curvas de Secagem em Frutos de Cajá*, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Especial, n.1, 63-68, 2003.
- Pontes, S. F. O., Santos, C. T., Bonomo, R. C. F., Pontes, L. V., Fontan, R. C. I., *Determinação das Curvas de Secagem em Camada Delgada de Pimenta de Cheiro (Capsicum chinense) a Diferentes Temperaturas*, Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.11, n.2, 143-148, 2009.
- Martinazzo, A. P., Corrêa, P. C., Resende, O., Melo, E. C., *Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão*, Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.11, n.3, p.301–306, 2007.

IV. Boletins de Análise

IV.1. Modelo utilizado para análise das águas da FEUP

Resultados das análises bacteriológicas

Requerente:

Localização:

Amostra:

Data:

Parâmetros analisados

Volume Inoculado	Heterotróficos totais a 22 °C	Heterotróficos totais a 37 °C	Fungos	Actinomicetes	P.aeruginosa
	Plate Count Agar, 72 h	Plate Count Agar, 48 h	Potato Dextrose Agar,	Actinomycets Isolation Agar,	Cetrimida, 48 h a 37 °C
1mL					
10 ⁻¹					
10 ⁻²					
10 ⁻³					
10 ⁻⁴					

Resultados finais (ufc/250 mL)

HT a 22 °C	
HT a 37 °C	
Fungos	
Actinomicetes	
P.aeruginosa	

IV.2. Modelo utilizado na determinação da *E.coli* e Enterococos fecais

Resultados das análises bacteriológicas

Requerente:		Colheita		Início da análise		Observações	
Localização:		Dia					
Amostra:		Hora					
Volume inoculado	TESTES PRESUNTIVOS						
	<i>E.coli</i> e bactérias coliformes				Enterococos fecais		
	Membrane Lauryl Sulfate Broth 30 °C, 4 h + 44 °C, 14 h				Slanetz and Bartley 36 ± 2 °C, 44 h ± 4 h		
	ufc amarelas		ufc duvidosas		ufc vermelhas/castanhas/rosas		ufc duvidosas
							TMTC - too much to count
(O) Origem e descrição da ufc	TESTES CONFIRMATIVOS						
	<i>E.coli</i> e bactérias coliformes 35 °C, 24 a 48 h					Enterococos fecais 44 ± 0,5 °C, 2 h	
	(O)	Cor amarela	Gás	MUG	Indole	(O)	BEA
							+ teste positivo - teste negativo
RESULTADOS FINAIS							ufc – unidades formadoras de colónias
<i>E.coli</i> e Bacterias coliformes				ufc/100 ml			
Enterococos fecais				ufc/100 ml			

Técnica analista

Responsável pela análise

Sílvia Faia

Dra. Olga Nunes

IV.3. Modelo utilizado na determinação de coliformes totais, fecais e enterococos fecais

Resultados das análises bacteriológicas

Requerente:				Colheita				Início da análise				Observações
Localização:				Dia								
Amostra:				Hora								
Volume inoculado	TESTES PRESUNTIVOS											
	Coliformes totais				Coliformes fecais				Enterococos fecais			
	mEndoLesAgar (35 ± 0,5 °C) 24 h ± 1 h				mFCAgar (44,5 ± 0,2 °C) 24 h ± 1 h				mEnterococcusAgar (35 ± 0,5 °C) 48 h ± 2 h			
	ucf brilho metálico		ucf duvidosas		ucf azuis		ucf duvidosas		ucf castanho/rosadas		ucf duvidosas	
												TMTC - too much to count
(O) Origem e descrição da ufc	TESTES CONFIRMATIVOS											
	Coliformes totais (35 ± 0,5 °C) 48 h ± 2 h				Coliformes fecais (44,5 ± 0,2 °C) 48 h ± 2 h				Enterococos fecais (35 ± 0,5 °C) 24 h ± 2 h			
	(O)	LTB	BGB2%	(O)	EC	(O)	BEA	Catalase				
RESULTADOS FINAIS												
Coliformes totais				ucf/100 ml								
Coliformes fecais				ucf/100 ml								
Enterococos fecais				ucf/100 ml								
Salmonelas				Presença/ausência								
ufc – unidades formadoras de colónias												
ND – não determinado												

Técnica analista

Responsável pela análise

Sílvia Faia

Dra. Olga Nunes